

**BRUNO GONÇALVES BOTELHO**

**Perfil e teores de aminas bioativas e  
características físico-químicas em cervejas**

**Faculdade de Farmácia, UFMG**

**Belo Horizonte, MG**

**2009**

**BRUNO GONÇALVES BOTELHO**

**Perfil e teores de aminas bioativas e  
características físico-químicas em cervejas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Beatriz Abreu Glória

**Faculdade de Farmácia, UFMG  
Belo Horizonte, MG  
2009**

**(Pagina de aprovação)**

## **AGRADECIMENTOS**

Às três mulheres mais importantes da minha vida: Minha mãe e irmã, pelo apoio incondicional às minhas escolhas, e a Raissa, que esteve ao meu lado em vários momentos difíceis, me incentivando e estimulando a melhorar sempre e que compartilhou comigo essa nova paixão pelos novos sabores e aromas descobertos no universo da cerveja.

À Prof<sup>a</sup> Dr. Maria Beatriz Abreu Glória, pelas dicas, conselhos, orientações e ensinamentos durante o mestrado;

Ao CNPq, pelo suporte financeiro que possibilitou a realização deste trabalho;

Aos amigos do LBqA, que compartilharam comigo todos os percalços e êxitos deste trabalho, pelas “orientações em entre amigos”, conversas (nem sempre sobre assuntos de interesse masculino), festas surpresas (nem sempre tão surpresas), e por tornar o laboratório um ambiente agradável e prazeroso;, em especial ao Guilherme, que acompanhou de perto todos os problemas e sucessos deste trabalho.

Aos colegas do LANAGRO/MG, pela compreensão da minha dupla jornada de trabalho, e conselhos e dicas que com certeza colaboraram para um melhor resultado;

Aos professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos das UFMG, que ajudaram, de forma direta ou indireta, para a finalização deste trabalho;

Ao Prof. Renato Lins, por despertar em mim um interesse tecnológico e científico pela cerveja;

À Prof<sup>a</sup> Lúcia Peret e Brian Scoggin, pelos ensinamentos, dicas, incentivos e “aulas práticas” sobre o mundo cervejeiro;

Aos amigos da Kudbier, por acreditarem em meu trabalho, pelos ensinamentos, pelas amostras fornecidas (e as degustadas também!);

Aos amigos que acompanharam nesta jornada pelo mundo da cerveja, descobrindo pequenos detalhes que tornaram este mundo cervejeiro ainda mais interessante e gostoso para todos nós.

*"Era um homem sábio aquele que inventou a cerveja."*

(Platão)

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	9
LISTA DE TABELAS .....	10
ABREVIATURAS .....	11
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
INTRODUÇÃO .....	14
REVISÃO DE LITERATURA.....	16
1. CERVEJAS.....	16
1.1. LEGISLAÇÃO BRASILEIRA .....	17
1.2. CLASSIFICAÇÃO E TIPOS DE CERVEJAS.....	18
1.3. MATÉRIAS PRIMAS.....	18
1.3.1. Malte de cevada .....	18
1.3.2. Água .....	20
1.3.3. Lúpulo.....	20
1.3.4. Leveduras.....	21
1.3.5. Adjuntos.....	22
1.4. PROCESSAMENTO .....	23
1.4.1. Produção do mosto .....	23
1.4.2. Processo fermentativo .....	26
1.4.3. Acabamento .....	27
1.5 MICROCERVEJARIAS .....	28
1.6 ASPECTOS NUTRICIONAIS DA CERVEJA.....	29
1.7 CONSTITUINTES QUÍMICOS DA CERVEJA.....	30
1.7.1. Etanol .....	31
1.7.2. Dióxido de carbono.....	31
1.7.3. Carboidratos .....	32
1.7.4. Lipídios .....	33
1.7.5. Compostos fenólicos .....	33
1.7.6. Proteínas, polipeptídios e aminoácidos .....	34
2. AMINAS BIOATIVAS .....	35
2.1. ASPECTOS GERAIS.....	35
2.2. BIOSÍNTESE .....	36
2.3. FUNÇÕES .....	38
2.4. EFEITOS TOXICOLÓGICOS.....	38
2.5. AMINAS BIOATIVAS EM CERVEJAS .....	41

MATERIAL E MÉTODOS.....	45
1. MATERIAL.....	45
2. MÉTODOS.....	47
2.1. ANÁLISE DE AMINAS BIOATIVAS.....	47
2.1.1. Condições cromatográficas.....	47
2.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	48
2.2.1. pH e acidez total.....	49
2.2.2. Teor alcoólico.....	49
2.2.3. Análises de extrato real.....	49
2.2.4. Amargor.....	49
2.2.5. Cor.....	49
2.2.6. Extrato original, aparente e grau de fermentação.....	50
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
1. AMINAS BIOGÊNICAS EM CERVEJAS.....	51
1.1. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA.....	51
1.1.1. Linearidade.....	51
1.1.2. Seletividade.....	51
1.1.3. Precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação.....	54
1.2. PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS EM CERVEJA.....	55
1.2.1. Perfil de aminas bioativas nas amostras analisadas.....	55
1.2.2. Perfil de aminas bioativas nos diferentes grupos de cerveja.....	56
1.3. TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM CERVEJA.....	57
1.3.1. Teores de espermidina.....	58
1.3.2. Teores de agmatina.....	59
1.3.3. Teores de putrescina.....	59
1.3.4. Teores de tiramina.....	60
1.3.5. Outras aminas bioativas.....	61
1.3.6. Contribuição dos teores de aminas ao teor total.....	61
1.4. ÍNDICE DE AMINAS BIOGÊNICAS PARA CERVEJAS.....	62
2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS.....	63
2.1. pH E ACIDEZ.....	63
2.2. TEOR ALCOÓLICO.....	64
2.3. COR.....	65
2.4. AMARGOR.....	65
2.5. EXTRATO ORIGINAL.....	65
2.6. EXTRATO APARENTE E REAL.....	66
2.7. GRAU DE FERMENTAÇÃO.....	66
3. CORRELAÇÃO ENTRE AMINAS E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	67

CONCLUSÕES .....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70



## LISTA DE FIGURAS

1. Alguns componentes presentes nos óleos essenciais do lúpulo.....	21
2. Fluxograma de processamento da cerveja. ....	24
3. Formação e degradação do diacetil na cerveja em maturação.....	27
4. Alguns compostos fenólicos presentes na cerveja.....	34
5. Estrutura química de algumas aminas bioativas. ....	36
6. Precursores de algumas aminas bioativas.....	37
7. Absorção de aminas na ausência e na presença de atividade enzimática. ....	40
8. Variação da % de acetonitrila durante a corrida cromatográfica.....	48
9. Cromatograma de solução padrão com as 10 aminas analisadas.....	51
10. Cromatograma comparativo entre amostra adicionada de padrão contendo as dez aminas analisadas (vermelho) e amostra pura (preto). ....	52
11. Gráficos de efeito de matriz para as dez aminas analisadas, comparando curvas em solvente com curvas em matriz adicionada.....	53
12. Percentual de ocorrência das dez aminas nas amostras analisadas.....	55
13. Percentual de ocorrência das aminas nos diferentes grupos de cervejas.....	57
14. Percentual de contribuição de cada amina para o teor total de aminas encontrados nas amostras analisadas.....	62
15. Índice de aminas biogênicas das amostras de cervejas adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de junho a dezembro de 2008. .	62

## LISTA DE TABELAS

1. Países com maior consumo per capita de cerveja.....	17
2. Teores de minerais na água dos principais centros cervejeiros.....	20
3. Composição da cerveja e a relação com a ingestão diária recomendada .....	30
4. Doçura relativa e níveis de alguns açúcares simples na cerveja .....	32
5. Efeitos farmacológicos de algumas aminas .....	39
6. Teores de aminas bioativas em diferentes tipos de cerveja.....	42
7. Teores de aminas em cervejas armazenadas por até 8 dias a 21 °C .....	43
8. Teores de aminas em cervejas analisadas por diferentes pesquisadores .....	43
9. Amostras adquiridas no mercado comum de Belo Horizonte, MG, categorizadas por tipo, país de origem e produção .....	45
10. Curvas de calibração das dez aminas analisadas com as respectivas equações lineares e coeficiente de correlação.....	52
11. Limites de detecção e quantificação das aminas analisadas .....	54
12. Teores de aminas encontrados em amostras de cerveja adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG no período de junho a dezembro de 2008.....	58
13. Características físico-químicas das amostras de cervejas adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de junho a dezembro de 2008.....	64
14. Correlação entre aminas e características físico-químicas das amostras.....	67

## ABREVIATURAS

AGM – Agmatina

BAI – Índice de aminas biogênicas

BAIc – Índice de aminas biogênicas para cervejas

DAO – Diaminoxidase

CAD – Cadaverina

EBC – European Brewery Commission

EPD – Espermidina

EPM – Espermina

FEN – Feniletilamina

HIM – Histamina

IBU – International Bitterness Unit

IMAO – Inibidor de monoamino oxidase

MAO – Monoaminoxidase

PIR – Pirrolidina

PRP – Propilamina

PUT – Putrescina

SRT - Serotonina

TIM – Tiramina

TRM – Triptamina

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar o perfil e os teores de aminas bioativas e as características físico-químicas de cervejas comercializadas no município de Belo Horizonte, MG. As aminas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-par iônico), coluna C18 fase reversa, derivação pós-coluna (o-ftalaldeído) e detecção fluorométrica. Também foi determinado o pH, acidez, teor alcoólico, cor, amargor, extrato real, original e aparente e grau de fermentação. Espermidina, agmatina, putrescina e cadaverina foram detectadas em 100% das amostras; triptamina em 80% das amostras e a histamina em 28% das cervejas analisadas. Feniletilamina foi detectada em apenas uma e serotonina e espermidina não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas. A agmatina foi a amina predominante, com teores entre 7,0 e 22,0 mg/L; seguida da putrescina (1,7 a 4,0 mg/L), cadaverina (0,2 a 0,9 mg/L), e espermidina (não detectado a 0,7 mg/L). A tiramina encontrada em todas as amostras em teores que variaram de 0,5 a 2,3 mg/L, valores estes seguros mesmo para pacientes que utilizam medicação inibidora de monoaminoxidases. Todas as amostras apresentaram índice de aminas biogênicas entre 0,2 e 0,6, o que indica a excelente qualidade microbiológica das cervejas analisadas. Com relação às análises físico-químicas, apenas uma amostra do tipo Extra apresentou extrato original (12,3%) fora do exigido pela legislação (12,5 – 14,0% para cervejas tipo Extra). Dos parâmetros físico-químicos analisados, a acidez e o pH correlacionaram com as aminas, exceto com a espermidina. Houve correlação das aminas com o amargor, o que pode ser relevante na qualidade sensorial da cerveja. Entre as aminas, putrescina, agmatina, cadaverina e tiramina correlacionaram entre si, indicando que elas possuem a mesma origem ou são influenciadas pelos mesmos fatores.

**Palavras chave:** aminas biogênicas, cervejas, índice de aminas, controle de qualidade, análises físico-químicas.

## ABSTRACT

**Profile and levels of bioactive amines and physico-chemical characteristics of beers.** Spermidine, agmatine, putrescine and cadaverine were detected in 100% of the samples; tryptamine in 80% of the samples and histamine in 28% of the beer samples analyzed. Phenylethylamine was detected in only one sample whereas serotonin and spermidine were not found in any sample analyzed. Agmatine was the prevalent amine, with levels ranging from 7.0 to 22.0 mg/L; followed by putrescine (1.7 to 4.0 mg/L), cadaverine (0.2 to 0.9 mg/L), and spermidine (not detected to 0.7 mg/L). Tyramine was found in every sample at levels ranging from 0.5 to 2.3 mg/L, which are safe even for patients under monoamine oxidase inhibitors. Every sample analyzed showed biogenic amines index between 0.2 and 0.6, which indicates excellent microbiological quality of the samples analyzed. Regarding the physico-chemical characteristics of the beer samples, they were all in compliance with the Brazilian legislation, except for the Extra beer which did not reach the accepted values. Among physico-chemical parameters, the acidity and the pH correlated significantly with the amines, except with spermidine. There was significant correlation between amines and bitterness, what can be of relevance to the sensorial quality of the beer. Among the amines detected, putrescine, agmatine, cadaverine and tyramine correlated among them, indicating that they had the same origin or are affected by the same factors.

**Keywords:** biogenic amines, beers, biogenic amine index, quality control, physico-chemical analysis.

## INTRODUÇÃO

A cerveja é umas das bebidas mais antigas que se tem notícia. Surgiu juntamente com o domínio do cultivo de cereais pelo homem, sendo observados registros da sua fabricação e ingestão entre povos como os egípcios, babilônios, gregos e romanos. Atualmente, é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo, inclusive no Brasil, onde, somente no ano de 2005, o faturamento da indústria cervejeira foi de 19,1 bilhões de reais.

As amins bioativas são compostos naturalmente presentes nos alimentos. Nos últimos anos ganharam um enfoque especial, pois passaram a ser associadas à saúde e também a algumas patologias. Algumas amins são essenciais ao crescimento e renovação celular e atuam como antioxidantes. Entretanto, em concentrações elevadas, podem causar efeitos adversos, como intoxicação por histamina, enxaqueca e reações adversas, principalmente em pessoas mais sensíveis. As amins são também relevantes, pois podem ser usadas como indicador da qualidade higiênico-sanitária prevalente durante a produção do alimento.

A presença de amins bioativas em cervejas produzidas no Brasil foi estudada por GLORIA e IZQUIERDO-PULIDO, em 1999, revelando teores aceitáveis na grande maioria das amostras analisadas. Entretanto, a partir de 1999, o mercado nacional de cerveja sofreu uma grande mudança. Houve associação entre empresas nacionais e estrangeiras e o surgimento de novas marcas, ditas “populares”, que visam atender as classes mais baixas, oferecendo preços mais acessíveis. Outro fenômeno, que causou uma mudança significativa no mercado cervejeiro nacional, foi o surgimento e crescimento do mercado de microcervejarias que atendem a um público mais específico e oferecem produtos diferenciados.

Desta forma, é necessária uma nova avaliação da qualidade de cervejas, tanto industrializadas como as produzidas por microcervejarias, uma vez que a cerveja pode ser causadora de intoxicação por amins em pessoas sensíveis e, também, naquelas que estejam utilizando medicamentos inibidores da monoaminoxidase (IMAO). Os efeitos adversos podem acometer também pessoas saudáveis, uma vez que a cerveja é ingerida geralmente em quantidade superior às demais bebidas fermentadas, e o álcool é um fator potencializante da ação das amins.

O presente trabalho teve como objetivo geral determinar o perfil e os teores de aminos bioativas, assim como as características físico-químicas das cervejas comercializadas em Belo Horizonte, MG.

Os objetivos específicos foram:

- (i) determinar o perfil e teores de aminos bioativas nas cervejas e aplicar o índice de qualidade proposto por LORET et al. (2005);
- (ii) avaliar pH, acidez, cor, amargor, extrato real, original e aparente, grau de fermentação e teor alcoólico e verificar o atendimento à legislação brasileira;
- (iii) verificar se existe correlação entre os teores de aminos bioativas e as características físico-químicas das cervejas.

# REVISÃO DE LITERATURA

## 1. CERVEJAS

Estima-se que o homem começou a utilizar bebidas fermentadas há 30 mil anos, sendo que a produção de cerveja deve ter se iniciado por volta de 8000 a.C. Essa bebida foi desenvolvida paralelamente aos processos de fermentação de cereais e difundiu-se lado a lado com as culturas de milho, centeio e cevada, nas antigas sociedades estáveis. Há registros sobre a utilização da cerveja, na Antiguidade, entre os povos da Suméria, Babilônia e Egito. Esta bebida foi produzida por gregos e romanos durante o apogeu dessas civilizações (CEREDA e VENTURINI FILHO, 2005).

Na idade média, o lúpulo foi introduzido como matéria prima e a arte cervejeira teve algum avanço, devido ao início da produção em maior escala. Nesta época, ainda se utilizava toda espécie de ingrediente na elaboração da cerveja. Por este motivo, no ano de 1516, o Duque Guilherme IV da Bavária (Alemanha), aprovou o que atualmente é conhecido como a lei mais antiga sobre a manipulação de alimentos, a lei alemã *Reinheitsgebot*, relacionada com a elaboração da cerveja, que deveria ser produzida somente com cevada, lúpulo e água.

No Brasil, o hábito de tomar cerveja foi trazido por D. João VI, no início do século XIX, durante a permanência da família real portuguesa em território brasileiro. Nessa época, a cerveja consumida era importada de países europeus. Atualmente, o Brasil é o 5º maior produtor de cerveja (8,5 bilhões L/ano), ficando atrás da China (27 bilhões L/ano), Estados Unidos (23,6 bilhões L/ano), Alemanha (10,5 bilhões L/ano) e Rússia (9 bilhões L/ano). Já com relação ao consumo per capita, o Brasil se encontra em 9º lugar, atrás de países como o Japão e Espanha (Tabela 1) (SILVA, 2005). Com a implantação do plano real, houve um aumento significativo no consumo per capita de cerveja, de 41,8 L/ano (1994) para 50,0 L/ano (1995), valor que permanece praticamente constante desde então. Outro fato que favoreceu o crescimento acelerado do consumo é o baixo custo de produção. O custo final do litro é de aproximadamente R\$ 0,60, um dos mais baratos do mundo (SINDICERV, 2007).



Tabela 1. Países com maior consumo per capita de cerveja

<b>País</b>	<b>Consumo (L/habitante)</b>
<b>Republica Checa</b>	158
<b>Alemanha</b>	117,7
<b>Reino Unido</b>	101,5
<b>Austrália</b>	92
<b>Estados Unidos</b>	84
<b>Espanha</b>	78,3
<b>Japão</b>	56
<b>México</b>	50
<b>Brasil</b>	47

Fonte: SINDICERV (2007).

O mercado mundial de cerveja apresenta um quadro muito heterogêneo. Enquanto o consumo per capita nas nações industrializadas estagnou ou até diminuiu, em regiões como a Europa Oriental e China o crescimento é acentuado. O mercado europeu ainda é o maior mercado de cerveja no mundo, com o maior consumo per capita. O consumo mundial de cerveja vem aumentando nos últimos anos. Pesquisas demonstram que a produção mundial de cerveja aumentou 12%, entre 1993 e 1999. O consumo per capita praticamente não se alterou. Em 1980 era de 20,9 litros e em 1996, 21,9 litros. Atualmente, está em torno de 22,5 litros, com tendência de aumento. O aumento médio anual mundial de produção de cerveja é da ordem de 25 milhões de hectolitros (CEREDA e VENTURINI FILHO, 2005).

### **1.1. LEGISLAÇÃO BRASILEIRA**

Cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. É considerado chope a cerveja que não foi pasteurizada no envase (BRASIL, 1997).

De acordo com a legislação brasileira, o malte de cevada e o lúpulo, usados na elaboração da cerveja, poderão ser substituídos por seus respectivos extratos. Parte do malte de cevada poderá ser substituída por cereais maltados ou não, e por carboidratos de origem vegetal transformados ou não. Os cereais referidos na legislação são: cevada, arroz, trigo, centeio, milho, aveia e sorgo, integrais, em flocos ou a sua parte amilácea. A quantidade de carboidrato (sacarose na forma de açúcar cristal ou refinado, açúcar invertido, glicose, frutose, e maltose) empregada na elaboração da cerveja, em

relação ao extrato primitivo, não pode ser maior que 15% na cerveja clara, 50% na cerveja escura e 10% na cerveja extra (BRASIL, 1997).

## **1.2. CLASSIFICAÇÃO E TIPOS DE CERVEJAS**

A cerveja pode ser classificada sob cinco formas diferentes: extrato primitivo, cor, teor alcoólico, proporção de malte de cevada e fermentação. Quanto ao extrato primitivo, a cerveja pode ser classificada como leve (entre 5 e 10%, em peso), comum (entre 10,5 e 12,5%, em peso), extra (entre 12,5 e 14%, em peso) e forte (acima de 14%, em peso). Quanto à cor, pode ser classificada como clara, quando a cor for correspondente a menos de vinte unidades EBC (European Brewery Convention) e escura quando for correspondente a mais de vinte unidades EBC. Quanto ao teor alcoólico, pode ser classificada como cerveja sem álcool (conteúdo de álcool menor que 0,5%), e cerveja com álcool (conteúdo de álcool igual ou superior a 0,5%). Quanto à proporção de malte de cevada, a cerveja pode ser classificada como puro malte (utiliza somente malte de cevada como fonte de açúcares), cerveja (possui mais de 50% de malte de cevada como fonte de açúcares) e cerveja com o nome do vegetal predominante (possui proporção de malte de cevada maior que 20% e menor que 50%, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares). Quanto à fermentação, pode ser classificada como cerveja de alta e baixa fermentação (BRASIL, 1997).

## **1.3. MATÉRIAS PRIMAS**

Atualmente, com exceção da Alemanha, que ainda segue a lei da pureza da Bavária, os demais países produtores fabricam cerveja com os ingredientes básicos (água, lúpulo e malte de cevada) acrescidos do adjunto (VENTURINI FILHO, 2000).

### **1.3.1. Malte de cevada**

A cevada é um cereal de cultivo muito antigo, utilizado em culturas neolíticas no Egito entre 6000 e 5000 a.C., bastante difundida por todo o mundo. É uma gramínea e pertence ao gênero *Hordeum*, cujos grãos, na espiga, podem estar alinhados em duas ou seis fileiras. Existem preferências por um ou outro tipo de cevada nos principais

centros cervejeiros do mundo. Na Europa, normalmente utiliza-se a de duas fileiras, e nos EUA, a de seis. Existem diversas espécies de cevada, com cultivo de acordo com a finalidade desejada (CEREDA, 1985).

Embora vários cereais possam ser satisfatoriamente maltados, a cevada é a que apresenta menores dificuldades técnicas no processo de maltagem. Por exemplo, o malte do milho apresenta problemas de ranço na fração lipídica; o trigo, durante a maltagem, sofre ação de microrganismos que crescem na superfície do grão. Além disso, a cevada apresenta alto teor de amido, em outras palavras, de extrato fermentável. A proteína encontra-se em quantidade e qualidade suficiente para a nutrição das leveduras durante a fermentação, assim como para a formação de espuma no produto final. Ainda mais, a cevada maltada confere sabor, odor e corpo característicos – normalmente agradável – à cerveja (CEREDA e VENTURINI FILHO, 2005).

Em termos simples, a maltagem é a germinação controlada de grãos de cereais. Essa visa o desenvolvimento enzimático, com a formação e ativação de enzimas não presentes no cereal não maltado, a degradação de compostos (amidos, proteínas) e a formação de alguns compostos da reação de Maillard, que serão responsáveis pela cor e sabor da cerveja.

A maltagem se inicia com a infusão para que o interior do grão absorva água. Isso é necessário para o crescimento da acospira no embrião. Também ocorre uma lavagem de materiais estranhos presentes no grão. A umidade normalmente fica em torno de 38 - 42%, mas pode chegar a 46-47% em grãos com defeitos ou como forma de acelerar o processo. Entretanto, infusões que geram grãos com alta umidade geralmente não resultam em malte de alta qualidade. Uma vez completada a infusão, os grãos são removidos da água. Nesse ponto, a germinação, que de fato já começou durante a infusão, é encorajada. O oxigênio é disponibilizado para promover a respiração.

A maltagem termina no forno, onde a umidade é removida por secagem. Esse é um ponto crucial, uma vez que o malte com alta umidade não pode ser adequadamente armazenado. Em casos extremos, mofo e/ou aromas indesejáveis podem ser detectados. Um valor amplamente difundido é 4% em peso de umidade no grão (FIX, 1999).

### 1.3.2. Água

O conteúdo mineral da água cervejeira já é apontado há muito tempo como um fator de grande contribuição para o sabor da cerveja, sendo especialmente importante porque constitui mais de 90% da cerveja.

Uma grande variedade de águas cervejeiras tem sido utilizada gerando vários estilos de cervejas (Tabela 2). Estas, através dos séculos, se tornaram famosas mundialmente. O pH, a alcalinidade e a dureza são os fatores mais importantes durante o processamento da cerveja, sendo necessário a correção dos mesmos dependendo do tipo de cerveja a ser produzido. Os teores dos íons presentes na água também exercem influência direta na formação do sabor da cerveja (GOLDAMMER, 1999).

Tabela 2. Teores de minerais na água dos principais centros cervejeiros

	Teores (ppm)					
	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Cl <sup>-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
<b>Burton-on-Trent</b>	54	24	352	16	820	320
<b>Pilsen</b>	32	8	7	5	6	37
<b>Munique</b>	10	19	80	1	6	333
<b>Londres</b>	24	4	90	18	58	123
<b>Dublin</b>	12	4	119	19	54	319
<b>Dortmund</b>	69	23	260	106	283	549

Fonte: (CEREDA e VENTURINI FILHO, 2005).

Uma boa água cervejeira deve ser potável, transparente, incolor, inodora e livre de qualquer sabor estranho. Se for água de superfície, pode ser necessário tratamento para reduzir ou eliminar matéria orgânica. Deve apresentar, na fonte, alcalinidade máxima de 50 ppm. Dentro desse limite de alcalinidade, pode-se trabalhar com o pH na faixa de 4 a 9 e possuir aproximadamente 50 ppm de cálcio. O teor de cloreto na forma de NaCl varia em função da preferência de sabor (CEREDA e VENTURINI FILHO, 2005).

### 1.3.3. Lúpulo

O lúpulo é uma planta dióica (apresenta flores masculinas e femininas) pertencente à família *Cannabaceae*. As flores femininas e os frutos recorrentes são ricos em glândulas amarelas, contendo lupulina, responsáveis pelo aroma e amargor característico do lúpulo de cerveja. Além de conferir aroma e amargor, o lúpulo também

possui ação anti-séptica, pois os ácidos iso-alfa são bacteriostáticos e contribuem para a estabilidade do sabor e da espuma da cerveja.

Sob a ótica cervejeira, as frações mais importantes da lupulina são as resinas e os óleos essenciais. As resinas são constituídas principalmente de ácidos alfa e beta, chamados humulonas, compostos responsáveis pelo amargor da cerveja.

Os óleos essenciais do lúpulo são uma mistura de várias centenas de componentes (Figura 1). Os principais são hidrocarbonetos da família dos terpenos, ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos e alcoóis. Os óleos essenciais apresentam influência tanto no sabor quanto no aroma da cerveja, embora a maior parte destes sejam arrastados com o vapor durante a fervura do mosto. Mas isso é desejável, uma vez que altas concentrações deixam a cerveja intragável (CEREDA e VENTURINI FILHO, 2005).

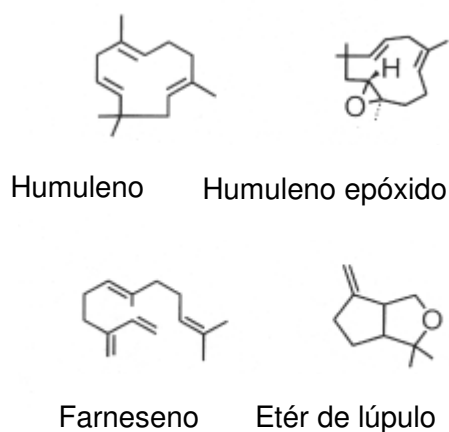


Figura 1. Alguns componentes presentes nos óleos essenciais do lúpulo.  
FONTE: BAMFORTH (2000).

#### 1.3.4. Leveduras

As leveduras são responsáveis pela conversão de açúcares fermentáveis em etanol e outros subprodutos. Existem centenas de variedades e tipos de leveduras. No passado, havia dois tipos de leveduras cervejeira: levedura Ale (de fermentação de topo, *Saccharomyces cerevisiae*) e a levedura Lager (de fermentação de fundo, *Saccharomyces uvarum*, chamada anteriormente de *Saccharomyces carlsbergensis*). Atualmente, como resultado de uma classificação recente da espécie *Saccharomyces*, ambas Ale e Lager foram consideradas membros da espécie *S. cerevisiae*.

As leveduras tipo Ale são melhor utilizadas em temperaturas variando entre 15 e 22 °C, entretanto algumas leveduras não fermentam abaixo de 12 °C. São geralmente denominadas como leveduras de fermentação de topo, já que sobem para a

superfície durante a fermentação formando uma camada grossa rica em leveduras. É por isso que o termo “fermentação de topo” é associado a leveduras tipo Ale.

As leveduras tipo Lager são utilizadas em temperaturas variando entre 7 e 15 °C. Nessas temperaturas, a levedura cresce de forma mais lenta, e com menos espuma superficial, tendendo a se sedimentar no fundo do fermentador quando a fermentação se aproxima do fim, sendo assim chamada de leveduras de fermentação de fundo. O sabor da cerveja será influenciado pela temperatura e pelo tipo de levedura utilizado na fermentação.

As leveduras de fermentação de topo são utilizadas em cervejas tipo Ale, Porter, Stout, Altbier, Kolsch e cervejas de trigo. Leveduras de fermentação de fundo são utilizadas para cervejas como Pilsen, Dortmund, Marzen, Bocks e American Malt Liquors (GOLDAMMER, 1999).

### **1.3.5. Adjuntos**

Adjuntos são cereais não-maltados, como milho, arroz, aveia, centeio, cevada e trigo. Estes são utilizados principalmente por fornecerem extrato a um baixo custo (uma fonte barata de carboidratos), comparado ao fornecido pelo malte de cevada, e por serem altamente disponível para as leveduras.

O uso do adjunto na cerveja resulta em um produto com alta estabilidade física, melhor resistência ao resfriamento e maior brilho. A maior estabilidade física se deve ao fato de que os adjuntos contribuem muito pouco com material protéico para o mosto e a cerveja, o que é vantajoso em termos de estabilidade coloidal. Adjuntos à base de arroz e milho praticamente não contribuem com proteínas solúveis para o mosto, enquanto outros adjuntos, como cevada ou trigo possuem altos teores de proteínas solúveis. Com exceção da cevada, os adjuntos têm pequena contribuição nos compostos fenólicos.

Adjuntos podem ser usados para ajustar a fermentabilidade do mosto. Muitos cervejeiros adicionam açúcar ou xarope diretamente na tina como uma maneira efetiva de se ajustar a fermentabilidade, obtendo melhores resultados do que quando se altera o tempo/temperatura de mostura.

O adjunto deve produzir açúcares fermentescíveis e dextrina não fermentescíveis em proporções semelhantes às que se obtém em um mosto feito exclusivamente com malte, e com o mínimo incremento possível de proteínas solúveis. O limite máximo de

adjunto na formulação da cerveja é determinado pela capacidade das enzimas do malte hidrolisarem todo o amido contido nas matérias-primas e pela capacidade do malte de prover a levedura de nutrientes – principalmente o nitrogênio.

No Brasil, de acordo com a legislação (BRASIL,1997), o nível de substituição do malte pelo adjunto pode chegar a 80%. Não há regra geral com relação à utilização de adjunto; cada cervejaria deve definir a proporção de malte/adjunto para cada tipo de cerveja que produz (VENTURINI FILHO, 2000).

## **1.4. PROCESSAMENTO**

O processamento industrial da cerveja pode ser dividido em três fases: (i) produção do mosto; (ii) processo fermentativo, e (iii) acabamento ou pós-tratamento. A produção do mosto envolve a moagem do malte, mosturação, filtração, fervura e clarificação do mosto. O processo fermentativo envolve a fermentação e a maturação. E o acabamento ou pós-tratamento envolve operações de filtração, carbonatação, modificação de aroma e sabor, padronização de cor e pasteurização (Figura 2) (VENTURINI FILHO, 2000).

### **1.4.1. Produção do mosto**

O processo de moagem do malte pode ser separado em duas categorias, moagem seca, em moinho de rolos, discos ou martelos, e moagem úmida, em moinho de rolos. O tipo de moinho usado depende do tipo de equipamento instalado na cervejaria. Quando o mosto é filtrado em tina de filtração, o moinho de rolos deve ser utilizado, ao passo que a filtração do mosto em filtro prensa exige moagem em moinho de martelos, discos ou rolos modificados.

Um malte bem moído deve possuir as seguintes características: ausência de grãos inteiros, maioria das cascas rasgadas longitudinalmente, ausência de partículas de endosperma aderidas à casca, endosperma reduzido a partículas pequenas e de tamanho uniforme e quantidade mínima de farinha fina.

O processo de transformação das matérias-primas cervejeiras em mosto denomina-se mosturação ou brassagem. A finalidade é recuperar, no mosto, a maior quantidade possível de extrato a partir do malte ou da mistura de malte e adjuntos.

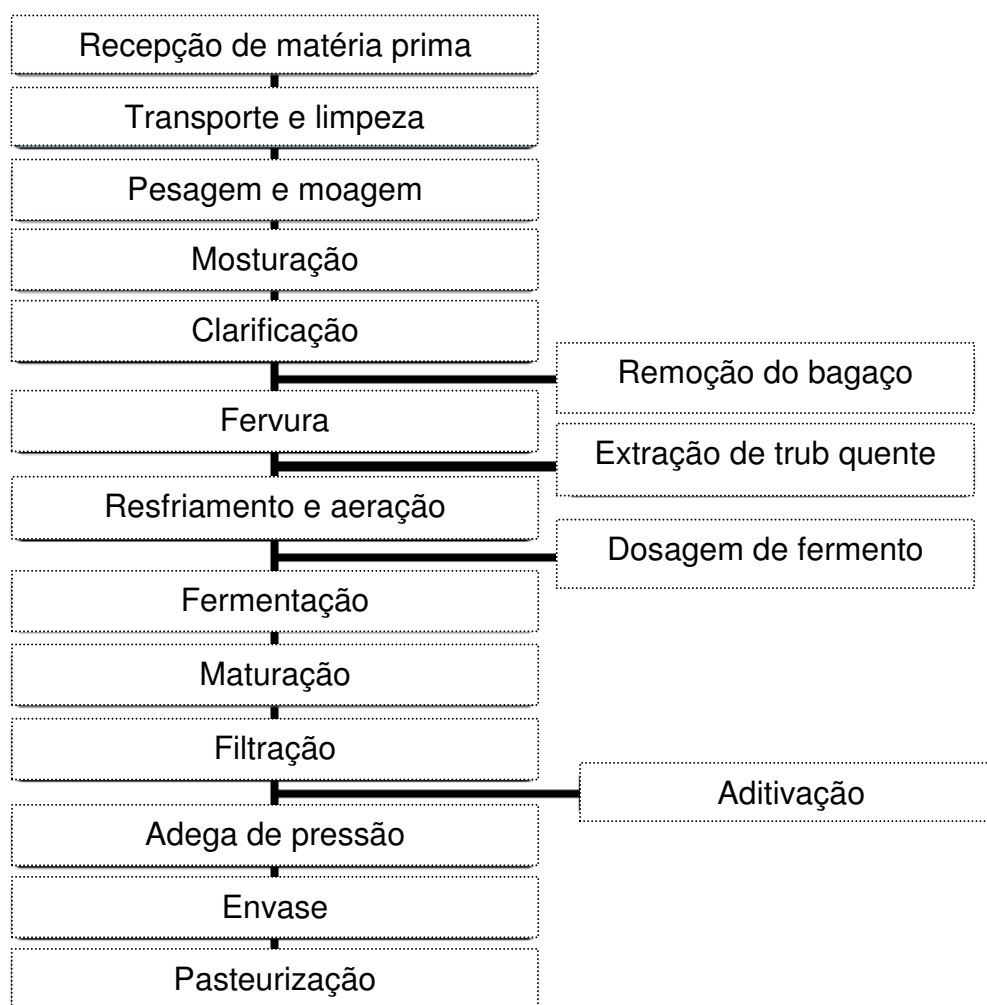


Figura 2. Fluxograma de processamento da cerveja.  
Fonte: SILVA (2005).

Uma pequena parte do extrato de mosto (10-15%) é constituída por substâncias prontamente solúveis em água. O restante é formado por produtos de degradação de macromoléculas pelas enzimas do malte. Assim, as amilases convertem o amido em açúcares fermentescíveis (maltose principalmente) e dextrina não fermentável; as proteases produzem peptídeos e aminoácidos pela digestão das proteínas; e as fosfatases liberam o íon fosfato orgânico para o mosto. Estas reações têm início no processo de maltagem e são aceleradas na mosturação, quando encontram condições ótimas de temperatura e pH, além da presença de grande quantidade de água (VENTURINI FILHO, 2000).

Os métodos de mosturação podem ser divididos em duas categorias principais: por infusão e por decocção. A infusão é mais comumente associada com a produção de *ales* e *stouts*, mas também é utilizada com sucesso em algumas *lagers*. O método da



decoção, desenvolvido amplamente como resultado do uso de maltes modificados ou fracos enzimaticamente, é geralmente utilizado na produção de cervejas *lagers*. Nesse sistema, uma porção do mosto (decoção) é retirado, levado à fervura, e misturado novamente ao mosto, para aumentar a temperatura (MONTANARI et al., 2005).

Após a mostura, quando todo o amido foi quebrado, é necessário separar o extrato líquido (mosto) dos sólidos (partículas dos grãos e adjuntos). A filtração é importante, pois os sólidos contêm grande quantidade de proteínas, amido pouco modificado, material graxo, silicatos e polifenóis. A filtração do mosto tem por objetivos produzir um mosto clarificado e obter uma boa recuperação do extrato.

É importante enfatizar que a qualidade da moagem afeta significativamente a clarificação do mosto, a recuperação do extrato e o tempo total de filtração, uma vez que uma moagem excessiva pode levar a quebra da casca da cevada em pedaços pequenos, que dificultam a sua filtração. Por outro lado, a moagem não pode ser muito grossa, pois irá expor menos o amido do presente no interior do grão. A moagem também é importante pois a própria casca da cevada atua como meio filtrante, ajudando na clarificação (GOLDAMMER, 1999).

A filtração do mosto normalmente é feita em duas etapas. Na primeira, a fração líquida simplesmente atravessa o leito filtrante, dando origem ao mosto primário. Na segunda, o resíduo sólido é lavado com água. A finalidade dessa lavagem é recuperar o extrato que fica retido na torta do filtro após a separação do mosto primário.

A temperatura da mistura durante a filtração deve estar por volta de 75 °C. Nessa temperatura, a viscosidade do mosto favorece a pronta e completa separação do resíduo; as enzimas do malte estão predominantemente inativas; o desenvolvimento bacteriano está bloqueado; e não existe o risco de extrair substâncias insolúveis das matérias-primas, principalmente taninos da casca do malte (VENTURINI FILHO, 2000).

A fervura do mosto proporciona estabilidade ao mosto em quatro sentidos: biológico (a microbiota que resistiu ao processo de mosturação e filtração é destruída), bioquímico (a enzima  $\alpha$ -amilase que, após a mosturação e a filtração, poderia apresentar alguma atividade é inativada), coloidal (concentração do mosto e eliminação das proteínas e dos taninos que são coagulados e eliminados do mosto por decantação), e sensorial (transferência dos componentes aromáticos e amargos do lúpulo para o mosto, aumento da cor e eliminação de voláteis). Nessa etapa não é

permitida a entrada de ar, pois a presença de oxigênio no mosto inibe a coagulação da proteína, assim como os taninos se oxidam a formas mais precipitáveis na presença do ar.

O processo de fervura não pode ser demasiadamente extenso, pois a reação de escurecimento não-enzimático (Reação de Maillard), que intensifica a cor do mosto, pode ter efeito negativo, alterando a cor e o sabor de modo a se perder as características desejáveis.

Depois da fervura, é necessário resfriar o mosto rapidamente, para evitar a contaminação por microrganismos, evitando assim a formação excessiva de dimetil sulfeto. O mosto passa, então, pelo trocador de calor e é resfriado imediatamente de 100 °C para 10 - 20 °C. Depois deste resfriamento, o mosto é oxigenado e transferido para o tanque de fermentação.

O oxigênio é muito prejudicial à cerveja, pois tem influência negativa sobre algumas características associadas à sua qualidade da cerveja como a cor, o paladar, e a estabilidade física e química; porém, esta é a única etapa que permite a presença de oxigênio.

O resfriamento do mosto tem como objetivo a adequação da temperatura àquela necessária para a inoculação do fermento (14 a 15 °C na alta fermentação e 6 a 12 °C na baixa fermentação), a eliminação de substâncias que podem causar turbidez, o fornecimento de condições adequadas de oxigênio à levedura para duplicação celular, respiração celular, e a síntese de ácidos graxos insaturados e esteróis (JUDICE, 2007).

#### **1.4.2. Processo fermentativo**

A fermentação alcoólica em si é uma técnica muito simples. Entretanto, quando se produz cerveja, o principal objetivo é um sabor balanceado, não somente uma fermentação eficiente e um alto teor alcoólico. Não é uma tarefa simples se atingir o sabor desejado, composto de inúmeras substâncias.

A maioria dos compostos que caracterizam sensorialmente a cerveja são produzidos durante a fermentação. A maturação é necessária e importante, mas poucas mudanças ocorrem nessa etapa. O componente-chave na maturação é o diacetil, que é formado como subproduto na fermentação. A formação está fortemente ligada com o metabolismo de aminoácidos. Esse composto é indesejável na cerveja e

sua concentração deve estar diminuída abaixo do nível de detecção mínimo. Infelizmente, este é muito baixo, 0,05 mg/L ou menos, e, no fim da fermentação, a concentração de diacetil se encontra bem acima desse valor. Durante o processo de maturação tradicional em baixas temperaturas, a concentração diminui lentamente, até um limite aceitável (Figura 3), e então a cerveja está maturada (LINKO et al., 1998).

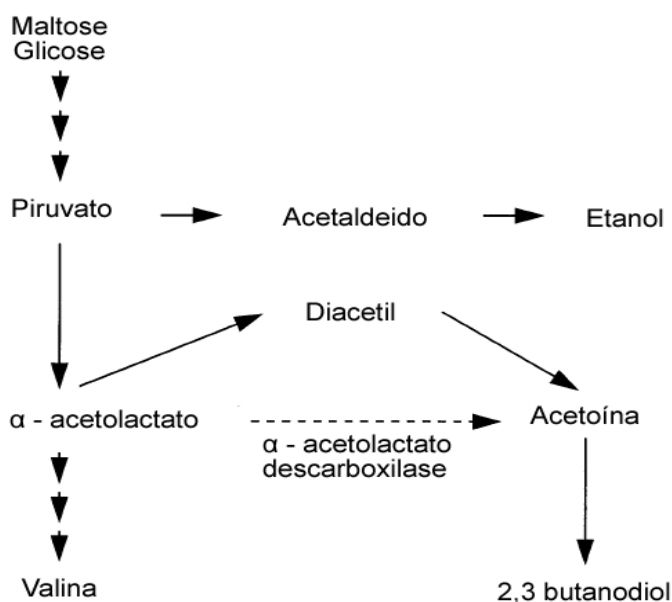


Figura 3. Formação e degradação do diacetil na cerveja em maturação.  
 FONTE: LINKO et al. (1998).

### 1.4.3. Acabamento

Após a maturação, a cerveja é filtrada para eliminar partículas menores em suspensão que ainda restaram na cerveja, deixando a bebida transparente e brilhante. A filtração não altera a composição e o sabor da cerveja, mas é fundamental para garantir sua apresentação, conferindo-lhe um aspecto cristalino.

O objetivo principal da filtração é tornar a cerveja límpida e cristalina com estabilidade microbiológica, físico-química, de espuma e sensorial (sabor e odor), pela retirada de microrganismos, partículas turvadoras, retirada ou diminuição de substâncias as quais podem, posteriormente, provocar a turvação. Além disso, são adicionados estabilizantes como a polivinilpolipirrolidona (PVPP) e antioxidantes como o metabissulfito e antioxin SB3 (JUDICE, 2007).

O nível de CO<sub>2</sub> dissolvido na cerveja após a fermentação varia de acordo com vários parâmetros, como a temperatura, pressão, levedura, tipo de tina de fermentação

e do mosto inicial. Tipicamente, os níveis de CO<sub>2</sub> variam de 1,2 a 1,7 volumes de dióxido de carbono por volume de cerveja (v/v) em fermentações não pressurizadas. Conseqüentemente, os níveis de CO<sub>2</sub> necessitam de ajustes, a menos que a cerveja seja feita de forma tradicional. É pratica comum aumentar o nível de CO<sub>2</sub> para um nível de 2,2 a 2,8 volumes antes do envase (GOLDAMMER, 1999).

A finalidade da pasteurização é conferir estabilidade biológica à bebida, mediante a destruição de microrganismos que deterioram a cerveja. Utilizam-se dois métodos de pasteurização, em trocadores de calor de placa modificados ou em túneis de pasteurização. No primeiro, a cerveja é pasteurizada antes do acondicionamento em garrafa, lata ou barril. Na prática, a cerveja é mantida por alguns segundos na temperatura de 75 °C. Na pasteurização em túnel, a cerveja é acondicionada em lata ou garrafa e depois pasteurizada. Neste sistema, a cerveja enlatada ou engarrafada, ao atravessar o túnel do pasteurizador, recebe calor mediante aspersão de água quente nas diversas seções do pasteurizador (VENTURINI FILHO, 2000).

## **1.5 MICROCERVEJARIAS**

O termo microcervejaria define uma instalação que permite a produção de cerveja em pequenas quantidades para consumo no local, ou eventual envasamento do excedente para consumo em outros locais. O envasamento neste caso é efetuado em barris de aço inox (Keg), latas ou garrafas de vidro. A capacidade de produção varia geralmente entre 10 e 30 hL (1.000 a 3.000 litros) por cozimento. O volume de cerveja produzida pode oscilar de poucos milhares de litros até dezenas ou mesmo centenas de milhares de litros por mês. Os equipamentos para as microcervejarias variam em complexidade e tamanho, de modo que podem atender a praticamente todas as demandas dos usuários.

O Brasil possui atualmente mais de 70 microcervejarias, sendo a maioria localizada nas regiões Sul e Sudeste. Mas a distribuição mais homogênea avança, de modo que se pode encontrar microcervejarias do Belém do Pará até o Rio Grande do Sul. Países tradicionais produtores de vinho, como a Itália e França, também têm se rendido às microcervejarias. A Itália possui hoje mais de 75 e a França mais de 120 microcervejarias. A Alemanha, além das 1.200 cervejarias de médio e grande porte, possuía, em 2004, mais de 360 microcervejarias, distribuídas por todo o país (PINTO, 2004).

As microcervejarias não concorrem diretamente com as grandes cervejarias, pelo fato de serem geralmente associadas à gastronomia e produzirem para consumo local, ou distribuírem para pontos de consumo próximos do local de produção, dispensando as complexas logísticas de distribuição, que é o forte das grandes empresas cervejeiras.

As grandes empresas cervejeiras apostam num produto massificado, com qualidade assegurada, porém de baixo preço. A indústria das microcervejarias tem como principal foco, consumidores que procuram por cervejas diferenciadas, de alta qualidade, feitas com puro malte e que muitas vezes buscam identificar-se com uma marca regional. O propósito dos empresários que atuam neste setor é encantar um nicho de mercado, com um produto diferente em sabor, aroma, *flavor*, cor e teor alcoólico, onde os clientes estejam dispostos a pagar um preço diferenciado por esse produto e serviço oferecido. Tipo de cerveja não falta. Em nível mundial, existem mais de 1500 tipos de cerveja, 500 só na Bélgica (KALNIN, 1999).

## 1.6 ASPECTOS NUTRICIONAIS DA CERVEJA

É difícil generalizar a relação entre cerveja e sua importância na ingestão de nutrientes, uma vez que a composição das cervejas pode variar consideravelmente dependendo da matéria prima e modo de produção. O conteúdo de álcool pode variar de 10% v/v em cervejas produzidas nos mosteiros Trapistas a < 0,05% em produtos sem álcool. A maioria das cervejas mundialmente produzidas possuem um teor alcoólico que varia entre 3 e 6% v/v.

A cerveja, se consumida moderadamente, possui vitaminas do complexo B (Tabela 3), sendo uma delas o ácido fólico, que tem ação redutora sobre a homocisteína, substância diretamente relacionada com doenças vasculares. Observando-se somente os teores das vitaminas, a cerveja é a mais completa dentre as bebidas alcoólicas.

Selênio também é freqüentemente citado como presente em cervejas. A taxa relativamente alta da relação sódio:potássio (4:1) é consistente com uma dieta com restrição de sódio, possuindo, a cerveja, um poder diurético muito superior ao da água. A cerveja possui normalmente entre 0,4 e 6,2 g/L de fibras. A *British Nutrition Foundation* preconiza 18 g como sendo o ideal para adultos. Pequenas doses de álcool estimulam o apetite e o intestino em pessoas idosas (BAMFORTH, 2002).

Tabela 3. Composição da cerveja e a relação com a ingestão diária recomendada

Parâmetro	Requerimento diário adulto (25 - 50 anos)		Quantidade (L)
	Homens	Mulheres	
Energia (Kcal)	2550	1940	150-1100
Proteína (g)	63	50	3-5
Carboidratos (g)	a	a	0-61
Gordura (g)	a	a	...
Vitamina A (µg)	1000	800	...
Vitamina D (µg)	5	5	...
Vitamina K (µg)	80	65	...
Vitamina E (mg)	10	8	...
Vitamina C (mg)	60	60	Até 30
Tiamina (mg)	1,5	1,1	0,003-0,008
Riboflavina (mg)	1,7	1,3	0,02-0,8
Niacina (mg)	19	15	3-8
Vitamina B (mg)	2	1,6	0,07-1,7
Folato (mg)	200	180	40-600
Biotina (µg)	30-100	20-100	2-15
Cálcio (mg)	800	800	40-140
Magnésio (mg)	800	800	90-400
Fósforo (mg)	350	280	60-200
Potássio (mg)	...	...	330-1100
Sódio (mg)	...	...	40-230
Ferro (mg)	10	15	0,1-0,5
Zinco (mg)	15	12	0,01-1,48
Selênio (µg)	70	55	<0,4-7,2

a - Para dietas contendo álcool recomenda-se que 15% do total energético seja de origem protéica, 33% lipídica e 47% de carboidratos.

Fonte: BAMFORTH (2002).

## 1.7 CONSTITUENTES QUÍMICOS DA CERVEJA

Em sua maioria, os constituintes químicos da cerveja advêm diretamente do malte de cevada, dos adjuntos, da água ou do lúpulo, ou são formados pela ação das leveduras. São eles, o etanol, o dióxido de carbono, os carboidratos, os lipídeos, compostos fenólicos, proteínas, polipeptídios e aminoácidos (BAMFORTH, 2000).

### 1.7.1. Etanol

Os efeitos do álcool na qualidade da cerveja são diversos. O etanol contribui diretamente para o sabor. Entretanto, modera a contribuição de outros componentes influenciando a divisão dessas moléculas entre o corpo da cerveja e o espaço logo acima dela. O etanol também influencia as propriedades espumantes da cerveja, diminuindo sua tensão superficial, promovendo, assim, a formação de bolhas. Entretanto, compete com outras substâncias (principalmente proteínas) por lugares nas paredes das bolhas, e isso diminui a estabilidade da espuma.

Comparada com outras bebidas alcoólicas, a cerveja contém níveis relativamente baixos de etanol, sendo a média das cervejas americanas de 4,6% ABV (álcool por volume), enquanto vinhos variam entre 9 e 15% ABV, e bebidas destiladas podem conter até 40% ABV. É importante lembrar que a gravidade específica do etanol é 0,79 g/cm<sup>3</sup>, o que significa que uma cerveja que contém 5% de álcool por volume tem aproximadamente 4% de álcool por peso (BAMFORTH, 2000).

### 1.7.2. Dióxido de carbono

O CO<sub>2</sub> é produzido mol a mol juntamente com o etanol durante a fermentação da cerveja pela levedura cervejeira (Equação 1).



Equação 1. Produção de etanol e CO<sub>2</sub> pelas leveduras, a partir da glicose.  
Fonte: BAMFORTH (2000).

O CO<sub>2</sub> fornece as borbulhas à cerveja, causando uma sensação de dor agradável pela interação com o nervo trigeminal, e possui um papel substancial na estabilidade da cerveja. O CO<sub>2</sub> também determina a extensão da formação da espuma e a liberação de compostos voláteis (BAMFORTH, 2000).

Algumas vezes, a formação de bolhas ocorre de forma espontânea quando a garrafa ou lata é aberta, um evento chamado *gushing* (esguicho, em inglês). Isso pode ser causado pela movimentação brusca do recipiente, mas em casos extremos, o *gushing* pode ocorrer por outras razões, como, por exemplo, contaminação do malte por fungos (BAMFORTH, 2000).

### 1.7.3. Carboidratos

A cerveja contém de 3,3 a 4,4 g/100 g de carboidratos, sendo que desse valor, 75 - 80% corresponde às dextrinas (acima de 4 unidades de glicose), 20 - 30% a mono e oligossacarídeos (menos que 4 unidades de glicose), e 5 - 8% a pentosanas, sendo o maior componente não volátil da cerveja (CORTACERO-RAMIREZ et al., 2003).

Sendo assim, o monitoramento da composição de carboidratos do mosto e da cerveja é de fundamental importância no processo de fabricação, principalmente no desenvolvimento de novos tipos de cerveja e na seleção de matéria prima e tipos de leveduras. Três polissacarídeos, amido, pentosana (arabinoxilano) e  $\beta$ -glucano, juntamente com a sacarose são as fontes primárias de carboidratos na cerveja (VINOGRADOV e BOCK, 1998).

Os sacarídeos contendo menos que quatro unidades de glicose que permanecem na cerveja após a fermentação, incluindo D-ribose, L-arabinose, D-xilose e D-galactose, encontradas como traços e a D-glicose e D-frutose são os principais monossacarídeos no mosto e representam aproximadamente 10% dos carboidratos totais do mosto. Os principais dissacarídeos são a maltose (14% dos carboidratos totais) e a sacarose (5%). Uma grande parte da sacarose vem do próprio malte, enquanto praticamente 97% da maltose presente é produzida durante a mosturação. A doçura relativa e os níveis de alguns açúcares simples na cerveja são mostrados na Tabela 4 (CORTACERO-RAMIREZ et al., 2003).

Tabela 4. Doçura relativa e níveis de alguns açúcares simples na cerveja

<b>Açúcar</b>	<b>Doçura relativa</b>	<b>Níveis encontrados (g/L)</b>
<b>Frutose</b>	1,1	0 - 0,19
<b>Glicose</b>	0,7	0,04 – 1,1
<b>Sacarose</b>	1,0	0 – 3,3
<b>Maltose</b>	0,5	0,7 – 3,0
<b>Maltotriose</b>	< 0,5	0,4 – 3,4

FONTE: CORTACERO-RAMIREZ et al. (2003).



#### **1.7.4. Lipídios**

A cevada possui aproximadamente 3 g/100 mL de gordura, sendo a sua maioria associada aos tecidos celulares. Entretanto, apenas uma pequena parte desses lipídios se faz presente na cerveja, o que a torna essencialmente um alimento sem gordura.

O baixo teor de gordura é interessante principalmente para a formação de espuma, pois os lipídios atuam de forma negativa, rompendo a rede de proteínas. Por esse motivo, a espuma desaparece rapidamente caso a cerveja entre em contato com algum material gorduroso quando está no copo, seja por sujidades presentes, ou pelo contato com o bigode de consumidores masculinos, ou com batom, no caso das mulheres. Além disso, a oxidação desses lipídios pode levar a formação de sabores indesejáveis (BAMFORTH, 2000).

#### **1.7.5. Compostos fenólicos**

A cerveja possui uma complexa mistura de compostos fenólicos, sendo encontrados na cerveja em valores que variam de 150 a 350 mg/L. Desse total, mais de 60% é derivado do malte (Figura 4) (CORTACERO-RAMIREZ et al., 2003).

Talvez o composto mais simples que influencie a qualidade da cerveja seja o ácido ferúlico. Em teoria, este é capaz de atuar como antioxidante, mas também é passível de sofrer descarboxilação por uma enzima presente em algumas bactérias, que leva a formação do 4-vinilguaiacol, que causa um sabor não desejável à cerveja. Essa enzima não é produzida pela levedura cervejeira, portanto o aparecimento dessa substância é indicio de contaminação por microrganismos. Outros compostos como a catequina e quercetina são reconhecidamente antioxidantes, inibindo a enzima lipoxigenase e atuando como seqüestradores de oxigênio (BAMFORTH, 2000).

Quando os compostos fenólicos se oxidam, podem sofrer polimerização, formando compostos polifenólicos. Tais compostos, na presença de certos polipeptídios, podem formar compostos insolúveis que podem causar turvação na cerveja (BAMFORTH, 2000).

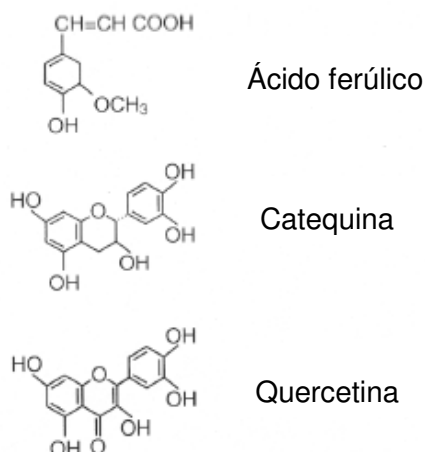


Figura 4. Alguns compostos fenólicos presentes na cerveja.  
 FONTE: BAMFORTH (2000).

### 1.7.6. Proteínas, polipeptídios e aminoácidos

É importante que o mosto contenha o balanço correto de aminoácidos para garantir o crescimento das leveduras e a fermentação do mosto. Proteólise suficiente deve ocorrer durante a maltagem e a mistura para gerar esses aminoácidos e remover as proteínas que podem causar turvação, ao se ligar com compostos fenólicos.

A presença de polipeptídios é importante para a formação da cerveja. Os polipeptídios anfipáticos constroem o suporte para as bolhas na espuma da cerveja; a parte hidrofóbica se afasta do corpo da cerveja, em direção a superfície das bolhas aonde entram em contato e interagem com outras moléculas hidrofóbicas, notadamente, as substâncias amargas (ácidos iso-alfa), em ligações que estabilizam a espuma.

Os aminoácidos livres na cerveja não fornecem benefício tecnológico. Se presentes em excesso, potencializam a contaminação do produto agindo como fonte de nitrogênio para os microrganismos (BAMFORTH, 2000).

Durante o processamento das cervejas, os aminoácidos livres podem sofrer a ação de enzimas aminoácido descarboxilases, ou pelo tratamento térmico, levando à formação de aminas biogênicas (SHALABY, 1996).

## 2. AMINAS BIOATIVAS

### 2.1. ASPECTOS GERAIS

Aminas bioativas são compostos orgânicos nitrogenados, em que um, dois, ou três átomos de hidrogênio da amônia foram substituídos por grupos alquila ou arila (Figura 5). São bases orgânicas alifáticas, alicíclicas ou heterocíclicas de baixo peso molecular que participam de processos metabólicos normais de animais, plantas e microrganismos (SILLA-SANTOS, 1996).

A denominação das aminas bioativas é função dos aminoácidos precursores. A histamina origina-se da histidina, a tiramina da tirosina e a triptamina do triptofano. A cadaverina e a putrescina foram encontradas em produtos em fase de decomposição ou putrefação, já a espermina e a espermidina foram isoladas pela primeira vez no fluido seminal, dando, assim, origem aos seus nomes (GLÓRIA, 2005).

As aminas bioativas podem ser classificadas em função do número de grupamentos amina, da estrutura química, da via biosintética e da função que exercem. Quanto ao número de grupamentos amina na molécula, têm-se as monoaminas (tiramina e feniletilamina), as diaminas (histamina, triptamina, serotonina, putrescina e agmatina) e as poliaminas (espermidina, espermina e agmatina) (BARDOCZ, 1995; SILLA-SANTOS, 1996). Com relação à estrutura química, as aminas podem ser classificadas em alifáticas (putrescina, cadaverina, espermidina, espermina e agmatina), aromáticas (tiramina e feniletilamina) e heterocíclicas (histamina e triptamina e serotonina) (SILLA-SANTOS, 1996) e, em função do grupo químico como catecolaminas (dopamina, noradrenalina e adrenalina), indolaminas (serotonina) e como imidazolaminas (histamina) (BARDOCZ, 1995).

Com relação à função que exercem, as aminas bioativas são classificadas em moduladoras e promotoras do crescimento (espermidina e espermina), por atuarem no crescimento e manutenção do metabolismo celular, e em vasoativas e neuroativas (tiramina, histamina e serotonina) devido ao seu efeito nos sistemas vascular e neural (BARDOCZ, 1995).

As poliaminas são componentes indispensáveis de todas as células. Apesar de serem essenciais para o crescimento, o papel exato no crescimento celular é incerto. Devido à diversidade de funções no metabolismo e crescimento celular, as poliaminas

são requeridas em grandes quantidades nos tecidos em crescimento (SILLA-SANTOS, 1996).

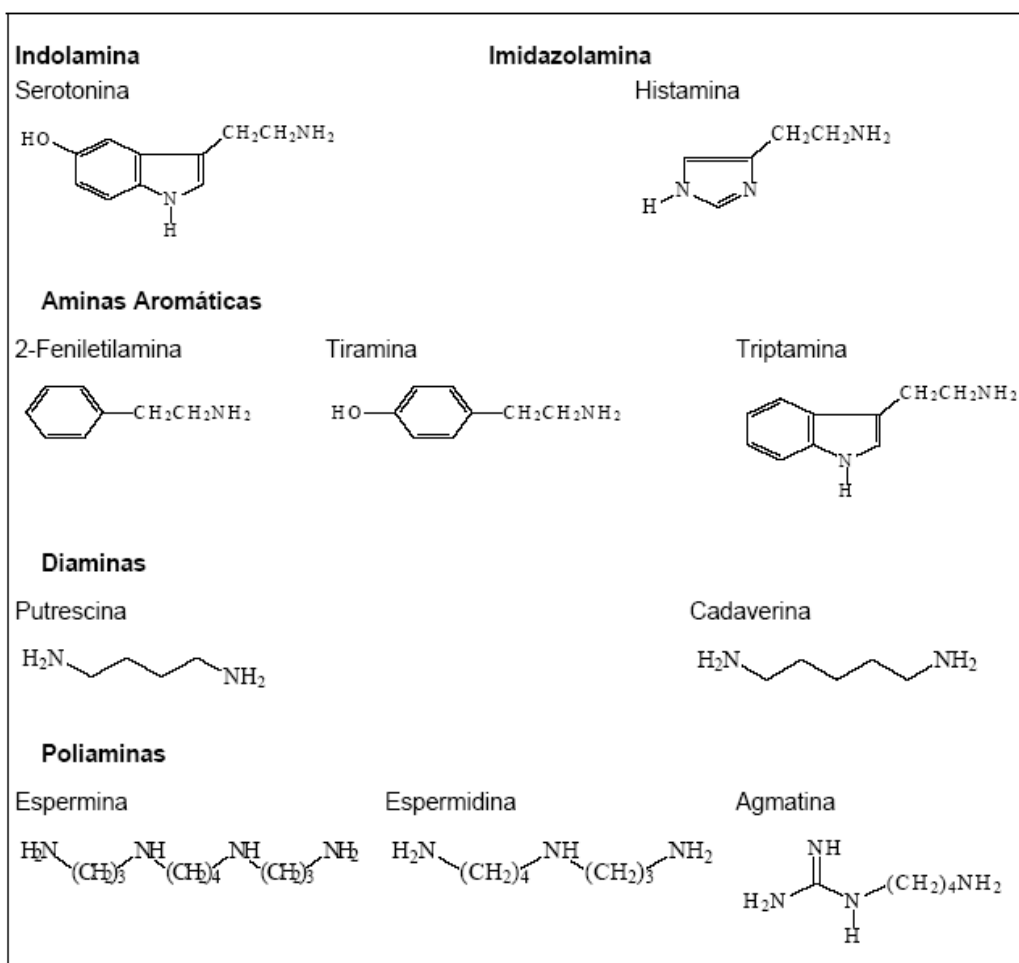


Figura 5. Estrutura química de algumas aminas bioativas.  
 Fonte: LIMA e GLORIA (1999).

## 2.2. BIOSÍNTESE

A síntese da histamina, tiramina, triptamina feniletilamina e cadaverina ocorre pela descarboxilação dos aminoácidos precursores histidina, tirosina, triptofano, fenilalanina e lisina, respectivamente (Figura 6). Na síntese da serotonina, o triptofano é transformado pela triptofano-hidrolase em 5-hidroxitriptofano, que é descarboxilado enzimaticamente em 5-hidroxitriptamina ou serotonina. A tirosina é precursora de aminas fenólicas como a octopamina e a dopamina (GLORIA e VIEIRA, 2007).

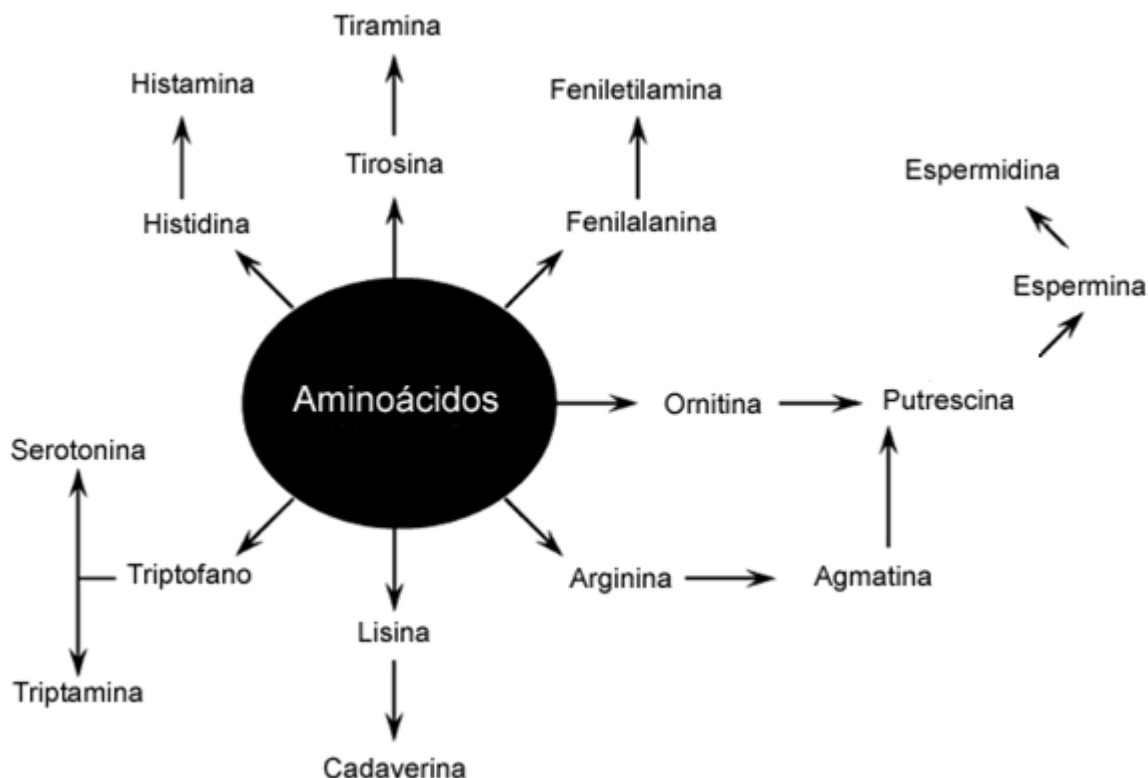


Figura 6. Precusores de algumas aminas bioativas.  
Adaptado de ANCIN-AZPILICUETA et al. (2008).

A descarboxilação de aminoácidos pode ser resultado de altas temperaturas ou da ação de enzimas microbianas. Microrganismos descarboxilase-positivos podem constituir parte da população microbiana normal ou serem provenientes de contaminação antes, durante ou depois do processamento. Pré-requisitos para a formação das aminas são a disponibilidade de aminoácidos livres, altas temperaturas de processamento, a presença de microrganismos descarboxilase-positivos e condições favoráveis ao crescimento microbiano e a atividade da descarboxilase (GLORIA e VIEIRA, 2007).

Aminoácidos livres podem ocorrer naturalmente em alimentos, mas também são liberados de proteínas, como resultado da atividade proteolítica ou degradação térmica. A produção de aminas por bactérias é afetada pelo pH, temperatura, tensão de oxigênio, presença de vitaminas e cofatores, disponibilidade de aminoácidos livres e açúcares fermentescíveis. Em valores de pH de 2,5 a 6,5, a produção de aminas por bactérias é estimulada como uma proteção contra o meio ácido. A atividade da descarboxilase depende da fase de crescimento do microrganismo, sendo maior na fase estacionária. Com relação à temperatura, a descarboxilase é mais ativa a temperaturas inferiores a 30 °C e inativa acima de 40 °C. (GLORIA e VIEIRA, 2007).

A síntese de poliaminas é um processo mais complexo, apesar dos primeiros passos também incluírem reações de descarboxilação. Em algumas plantas e microrganismos, o processo se inicia com a descarboxilação da ornitina a putrescina pela ornitina descarboxilase. Existem rotas alternativas para a produção de putrescina via agmatina pela arginina descarboxilase e da citrulina. A putrescina é um intermediário obrigatório na síntese de poliaminas (GLORIA e VIEIRA, 2007).

### **2.3. FUNÇÕES**

Além de seu papel biológico como fonte de nitrogênio e precursores na síntese de hormônios, alcalóides, ácidos nucleicos e proteínas, as aminas são importantes componentes do aroma de alimentos e precursores potenciais de compostos N-nitrosos (SILLA-SANTOS, 1996).

Certas classes de aminas, as catecolaminas, indolaminas e histamina, cumprem importantes funções metabólicas em humanos, especialmente no sistema nervoso e no controle da pressão sanguínea. Feniletilamina e tiramina causam aumento na pressão sanguínea. Histamina possui uma função biológica importante, servindo como um mediador primário dos sintomas imediatos percebidos em respostas alérgicas (SILLA-SANTOS, 1996).

### **2.4. EFEITOS TOXICOLÓGICOS**

Aminas biogênicas em altas concentrações são indesejáveis em alimentos, pois, dependendo da quantidade ingerida, podem causar dores de cabeça, disfunções respiratórias, palpitação, hiper ou hipotensão e uma série de desordens alérgicas (Tabela 5) (LOUVAND-FUNEL, 2001).

Tabela 5. Efeitos farmacológicos de algumas aminas

<b>Amina</b>	<b>Efeitos Farmacológicos</b>
<b>Histamina</b>	Libera adrenalina e noradrenalina Excita a musculatura lisa do útero, intestino e trato respiratório Estimula neurônios sensores e motores Controla a secreção de ácido gástrico
<b>Tiramina</b>	Vasoconstrição periférica Aumenta o fluxo cardíaco Causa salivação e lacrimejamento Aumenta taxa respiratória Aumenta o nível de glicose sanguínea Libera noradrenalina do sistema nervoso simpático Causa enxaqueca
<b>Putrescina e cadaverina</b>	Hipotensão Braquicardia Paresia das extremidades Potencializa o efeito de outras aminas Espasmos mandibulares
<b><math>\beta</math>-Feniletilamina</b>	Libera noradrenalina do sistema nervoso simpático Aumenta a pressão sanguínea Causa enxaqueca
<b>Triptamina</b>	Aumenta a pressão sanguínea

Fonte: SHALABY (1996).

A intoxicação por aminas pode ocorrer especialmente em conjunto com fatores potencializantes como drogas inibidoras de monoamina oxidase (IMAO), disfunções gastrintestinais e a presença simultânea de outras aminas (Figura 7). Álcool e acetaldeído também potencializam o efeito das aminas bioativas (PROESTOS et al., 2008). A intoxicação histamínica e as crises hipertensivas devido à interação entre alimentos e IMAO, assim como as enxaquecas induzidas por alimentos são as reações mais comuns associadas ao consumo de alimentos contendo grande quantidade de aminas biogênicas (ÖNAL, 2007).

A intoxicação mais comum por aminas em alimentos envolve a histamina, sendo o processo patológico caracterizado por um período curto de incubação (minutos a horas), e também por um período curto de duração (algumas horas) (SILVEIRA et al., 2001).

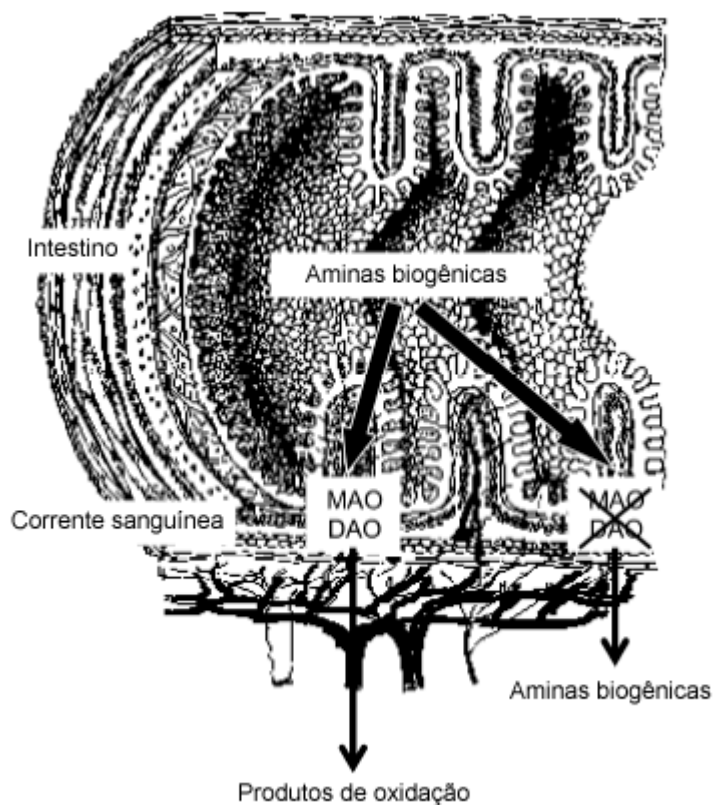


Figura 7. Absorção de aminas na ausência e na presença de atividade enzimática.  
 Fonte: ANCIN-AZPILICUETA et al. (2008).

A quantidade de aminas biogênicas em vários alimentos tem sido amplamente estudada devido ao seu potencial tóxico. Ingestão de histamina variando entre 8–40 mg, 40–100 mg, e acima de 100 mg podem causar efeitos adversos leve, moderado e intenso, respectivamente.

Aminas, como a tiramina, a triptamina e a  $\beta$ -feniletilamina têm sido indicadas como causadoras de crises hipertensivas em alguns pacientes, além de enxaqueca induzida por alimentos.

Os limites máximos de histamina e tiramina em alimentos estão na faixa de 50 a 100 mg/kg e 100 a 800 mg/kg, respectivamente. Putrescina, espermina, espermidina, e cadaverina não possuem efeitos adversos, mas podem potencializar o efeito da histamina e tiramina. Podem também reagir com nitrito, formando N-nitrosaminas carcinogênicas, e serem utilizadas como parâmetros de deterioração (SHALABY, 1996).

Independente do tipo de alimento, altos níveis de aminas biogênicas têm sido apontados em produtos resultantes de fermentação (embutidos fermentados, queijo e



bebidas alcoólicas fermentadas). A produção de aminas biogênicas em alimentos é característica de uma série de microrganismos capazes de descarboxilar aminoácidos, como Enterobacterias, *Pseudomonas* spp., Micrococcus, Enterococcus e bactérias lácticas (LORET et al., 2005).

A produção das aminas é facilitada pelo processo fermentativo, que na maioria das vezes oferece substrato (aminoácidos livres) e condições favoráveis para a sua formação (ROMERO et al., 2003).

Em condições normais, a influência negativa das aminas é reduzida pelo sistema digestivo por enzimas específicas. A desaminação oxidativa das aminas leva a outros produtos reativos, como aldeídos biogênicos, que são metabolizados para os respectivos ácidos pela aldeído desidrogenase. As rotas metabólicas das aminas e o álcool ingerido percorrem o mesmo caminho enzimático, então, é necessária uma maior atenção em bebidas fermentadas, nas quais a presença de etanol pode aumentar o efeito tóxico das aminas bioativas (SLOMKOWSKA e AMBROZIAK, 2002).

## **2.5. AMINAS BIOATIVAS EM CERVEJAS**

Os tipos e a concentração de aminas na cerveja são afetados principalmente pela qualidade das matérias primas, tecnologia empregada, contaminação microbiológica durante o processamento e condições de armazenamento.

As aminas presentes na cerveja podem ser divididas em três grupos, de acordo com sua origem. O primeiro grupo é representado pelas aminas naturalmente presentes na matéria prima, como a agmatina, putrescina, espermidina e espermina que são usualmente encontradas no malte. Altos teores de tiramina, 2-feniletilamina e poliaminas foram encontrados no lúpulo, mas a sua influência no teor total seria pequena, uma vez que a quantidade utilizada é muito pequena. O segundo grupo contém as aminas que são geradas durante o processo de mostura e cozimento do mosto, como a tiramina, agmatina e cadaverina. A formação dessas aminas é atribuída à ação de enzimas naturalmente presentes no malte e por decomposição térmica do aminoácido precursor correspondente. O terceiro grupo consiste na tiramina e triptamina que podem ser formadas durante a mostura e fermentação (SLOMKOWSKA e AMBROZIAK, 2002)

Os diferentes tipos de cerveja também apresentam um teor e perfil de aminas semelhantes. SLOMKOWSKA e AMBROZIAK (2002) analisaram cinco tipos diferentes

de cervejas (lager, pilsner, strong, stout e sem álcool) encontrando teores totais de aminos que variavam entre 11,38 a 17,64 mg/L. A cerveja sem álcool apresentou valores menores principalmente devido ao menor teor de espermina (Tabela 6).

Tabela 6. Teores de aminos bioativas em diferentes tipos de cerveja

Tipo de cerveja	Aminos bioativas (mg/L)								
	FEN	PUT	CAD	HIM	TIM	EPD	EPM	PRP	PIR
<b>Lager</b>	nd	1,93	0,62	0,44	1,18	3,67	6,63	0,47	0,57
<b>Strong</b>	nd	1,45	0,64	nd	0,94	3,64	8,53	0,75	1,05
<b>Stout</b>	nd	1,25	0,83	0,65	1,19	1,20	11,58	5,80	nd
<b>Sem álcool</b>	nd	1,84	nd	nd	1,15	2,70	5,21	0,58	0,32
<b>Pilsner</b>	0,67	2,09	0,71	0,72	0,86	4,00	9,98	0,66	0,38

FEN – Femiletilamina, PUT – Putrescina, CAD – cadaverina, HIM – histamina, TIM – Tiramina, EPD – espermidina, EPM – espermina, PRP – Propilamina, PIR – pirrolidina, nd – não detectado

Fonte: SLOMKOWSKA e AMBROZIAK (2002).

Um aumento nos teores de aminos durante o processamento da cerveja pode estar associado, principalmente, com más condições de higiene, e menos com processamento e armazenamento. A contaminação do mosto por microrganismos descarboxilase-positivos, como bactérias lácticas ou leveduras selvagens, leva à formação de aminos, como tiramina e histamina (SLOMKOWSKA e AMBROZIAK, 2002).

Segundo IZQUIERDO-PULIDO et al. (1995), *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* não possui descarboxilases específicas para histidina e tirosina, e não é responsável pela formação ou degradação de aminos durante a fermentação da cerveja. Isto indica que a biosíntese dessas duas aminos está ligada à contaminação microbiana durante o processamento, e não com a levedura cervejeira.

A idade das leveduras utilizadas no processo de fermentação também exerce influência na quantidade final de aminos, principalmente putrescina, cadaverina e agmatina. Uma levedura mais antiga (maior geração) resulta em um maior número de células mortas, e pela autólise celular é possível explicar tal aumento (HALASZ et al., 1999).

KALAC et al. (2002) analisaram o efeito do armazenamento da cerveja envasada com relação à formação de aminos biogênicas. Foi observado um aumento significativo de tiramina (Tabela 7), o que pode ser um indício de formação desta amina por via química, pois não foram identificados sinais da presença de microrganismos na cerveja, o que poderia explicar tal crescimento. Outra possível hipótese poderia ser a presença

das enzimas microbianas, produzidas durante o processamento, que continuariam a agir na cerveja mesmo após a pasteurização.

Tabela 7. Teores de aminas em cervejas armazenadas por até 8 dias a 21 °C

Cervejaria	Tempo (dias)	Teores de aminas (mg/L)				
		Histamina	Tiramina	Putrescina	Cadaverina	Espermidina
<b>A</b>	0	nd	10,5	5,4	2,1	5,2
	4	1,2	6,0	5,1	1,4	nd
	6	1,0	12,3	4,9	1,8	7,9
	8	2,0	16,6	5,8	1,5	8,4
<b>B</b>	0	2,2	1,1	7,9	0,7	nd
	3	1,6	1,0	7,3	0,9	nd
	6	2,3	1,5	6,1	0,7	nd
	8	3,0	3,6	7,6	1,3	nd
<b>C</b>	0	9,7	102,0	9,5	48,1	nd
	5	9,3	101,0	11,5	48,6	nd
	8	8,8	105,0	11,9	50,7	nd

nd – não detectado

Fonte: KALAC et al. (2002).

A cerveja tem sido freqüentemente apontada como um risco à saúde para alguns consumidores, devido à presença de aminas biogênicas. Crises hipertensivas foram observadas após o consumo de cerveja em pacientes tratados com drogas que inibem a monoamino oxidase (MAO) (KALAC et al., 2002). Normalmente são encontrados valores que não ocasionam riscos ao consumidor (Tabela 8).

Tabela 8. Teores de aminas em cervejas analisadas por diferentes pesquisadores

Tipo de cerveja	Teores de aminas biogênicas (mg/L)									Referência
	PUT	CAD	TIM	HIM	AGM	EPD	FEN	TRM	EPM	
Ice	4,1	0,5	1,1	0,2	10,4	0,6	0,1	0,2	0,2	GLORIA e IZQUIERDO-PULIDO (1999)
Stout e Porter	3,8	0,7	4,1	1,0	9,8	na	na	na	na	IZQUIERDO-PULIDO et al. (1996)
Cerveja de sorgo	0,4	0,2	0,1	0,03	na	na	0,3	0,02	na	LASEKAN e LASEKAN (1999)
Cerveja de trigo	6,2	nd	nd	0,2	8,7	nd	na	na	nd	DE BORBA e ROHRER (2007)
Extra	22,0	13,1	0,2	0,4	5,3	na	na	na	na	CORTACERO-RAMÍREZ et al. (2007)
Sem álcool	2,0	nd	1,3	nd	nd	0,9	nd	nd	nd	BUIATTI et al. (1995)
ne	4,4	0,3	7,0	2,1	na	1,1	na	na	0,3	LOUKOU e ZOUTOU (2003)

ne - não especificado; na - não analisado; nd - não detectado.

PUT – Putrescina, CAD – cadaverina, TIM – Tiramina, HIM – histamina, EPD – espermidina, FEN – Femiletilamina, TRM – triptamina, EPM – espermina.

MIETZ e KARMAS (1978) propuseram um índice de aminas biogênicas (BAI), para classificar pescado de acordo com a qualidade microbiológica. O índice variava de 1 a 10, sendo valores abaixo de 1 considerados livres de contaminação, entre 1 e 10 com contaminação moderada e acima de 10, altamente contaminados. Em 2005, foi proposto um índice de classificação específico para a cerveja ( $BAI_c$ ), que levava em consideração as aminas naturalmente presentes na cerveja (predominantemente a agmatina) e as aminas de origem bacteriana (tiramina, putrescina, cadaverina, histamina e feniletilamina), resultando na seguinte expressão (LORET et al., 2005):

$$BAI_c = \frac{[CAD] + [HIM] + [TIM] + [PUT] + [FEN] + [TRM]}{1 + [AGM]}$$

O controle dos teores de aminas biogênicas pode ser útil durante a fabricação de cerveja, pois pode ser utilizado como indicador da qualidade da matéria prima, das condições higiênico-sanitárias durante o processamento e qualidade do produto final.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. MATERIAL

Para a realização dos experimentos, foram adquiridas cervejas comercializadas em Belo Horizonte, MG. Vinte e cinco marcas de diferentes tipos e origens foram analisadas (Tabela 9). As amostras industrializadas foram analisadas em duplicata, três lotes distintos. Para as amostras importadas e de microcervejarias, devido à dificuldade de se conseguir diferentes lotes, foi analisado apenas um lote, em duplicata. A amostra de cervejaria artesanal foi gentilmente cedida pela Kudbier (Belo Horizonte, Brasil).

Tabela 9. Amostras adquiridas no mercado comum de Belo Horizonte, MG, categorizadas por tipo, país de origem e produção

<b>Amostra</b>	<b>Tipo cerveja</b>	<b>País de Origem</b>	<b>Produção</b>
<b>Grupo A</b>		<b>Trigo</b>	
025	Dunkel Weizenbock	Alemanha	Industrializada
019	Dunkel Weiss	Alemanha	Industrializada
020	Weiss	Alemanha	Industrializada
013	Witbier	Bélgica	Industrializada
<b>Grupo B</b>		<b>Pilsen</b>	
001	Pilsen	Brasil	Industrializada
002	Pilsen	Brasil	Industrializada
003	Pilsen	Brasil	Industrializada
004	Pilsen	Brasil	Industrializada
005	Pilsen	Brasil	Industrializada
008	Pilsen	Brasil	Industrializada
015	Pilsen	Brasil	Industrializada
<b>Grupo C</b>		<b>Puro Malte</b>	
007	Lager	Brasil	Industrializada
014	Lager	Brasil	Industrializada
023	Lager	Alemanha	Industrializada
021	Abbey	Bélgica	Industrializada
009	Extra	Brasil	Industrializada
006	Pale Ale	Brasil	Artesanal
011	Pilsen	Brasil	Microcervejaria
<b>Grupo D</b>		<b>Escura</b>	
016	Malzbier	Brasil	Industrializada
017	Malzbier	Brasil	Industrializada
018	Malzbier	Brasil	Industrializada
010	Stout	Brasil	Industrializada
012	Stout	Brasil	Industrializada
022	Stout	Brasil	Microcervejaria
024	Stout	Brasil	Microcervejaria

Para facilitar a comparação entre as cervejas, estas foram agrupadas, levando em conta suas similaridades, em quatro grupos: grupo A - cervejas de trigo; grupo B – pilsen; grupo C - puro malte; e grupo D - cervejas escuras.

Os reagentes utilizados eram de grau analítico, exceto os solventes utilizados na CLAE (acetonitrila e metanol), que eram de grau cromatográfico. Estes solventes orgânicos foram filtrados em membranas HVLP, com 47 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Toda a água utilizada era ultrapura obtida do Sistema Milli-Q Plus (Millipore Corp., Milford, MA, EUA).

Os padrões das aminas bioativas, histamina (HIM, dicloridrato), putrescina (PUT, dicloridrato), cadaverina (CAD, dicloridrato), tiramina (TIM, cloridrato), serotonina (SRT, cloridrato), agmatina (AGM, sal sulfato), espermidina (EPD, tricloridrato), espermina (EPM, tetracloridrato), 2-feniletilamina (FEM, cloridrato) e triptamina (TRM, cloridrato) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Para o preparo da solução padrão de cada amina, considerou-se a massa da base livre (sem a utilização da massa de cloreto ou sulfato) para resultar numa concentração de 1 mg/mL em ácido clorídrico 0,1 mol/L. A partir de alíquotas de 1 mL de cada uma das soluções individuais, obteve-se 10 mL de solução padrão contendo dez aminas.

O agente de derivação *o*-ftalaldeído (OPA) também foi adquirido da Sigma (St. Louis, MO, EUA). A solução derivante foi preparada dissolvendo-se 25 g de ácido bórico e 22 g de hidróxido de potássio em 500 mL de água ultrapura, cujo pH foi ajustado para 10,5 com solução de hidróxido de potássio. A esta solução foram adicionados 0,2 g de *o*-ftalaldeído dissolvido em 3 mL de metanol previamente filtrado, 1,5 mL de Brij 35 e 1,5 mL de mercaptoetanol. A solução derivante foi preparada imediatamente antes do uso, degaseificada em aparelho ultra som (UltraSonic Cleaner, Unique, SP, Brasil) e mantida sob abrigo da luz.

## 2. MÉTODOS

### 2.1. ANÁLISE DE AMINAS BIOATIVAS

O perfil e os teores das aminas bioativas presentes nas cervejas foram determinados segundo metodologia descrita por GLORIA e IZQUIERDO-PULIDO (1999).

As amostras foram filtradas em membrana HAWP em éster de celulose, com especificações de 13 mm de diâmetro e 0,45 µm de tamanho do poro (Millipore, Corp., Milford, MA, EUA), para posterior injeção e análise em CLAE por pareamento de íons em coluna de fase reversa, com quantificação por fluorimetria após derivação pós-coluna com *o*-ftalaldeído (GLORIA e IZQUIERDO-PULIDO, 1999).

#### 2.1.1. Condições cromatográficas

O cromatógrafo utilizado (Shimadzu, Kyoto, Japão) era composto por três bombas com conjunto de lavagem automática do pistão, sendo duas modelo LC-10 AD e uma LC-10 ADvp acoplada a uma câmara de mistura; injetor automático modelo SIL-10 ADvp; detector espectrofluorimétrico modelo RF-10AXL, com comprimento de onda de 350 e 450 nm de excitação e emissão, respectivamente; unidade de controle CBM-20 A conectada a um microcomputador; coluna Nova-pak® C18 de fase reversa (3,9 x 300 mm, 10 µm) e pré-coluna µBondapak (Waters, Milford, MA, EUA).

O gradiente de eluição era composto por duas fases móveis : Fase móvel A (acetato de sódio 0,2 mol/L e octanossulfonato de sódio 15 mmol/L) e fase móvel B (acetonitrila CLAE) (Figura 8). Fluxo total das fases móveis foi de 0,5 mL/minuto, e o fluxo da solução derivante foi de 0,3 mL/minuto. O tempo total de corrida foi de 68 minutos. Ao final da análise, por meio de uma curva analítica, foi calculada a concentração das aminas nas amostras.

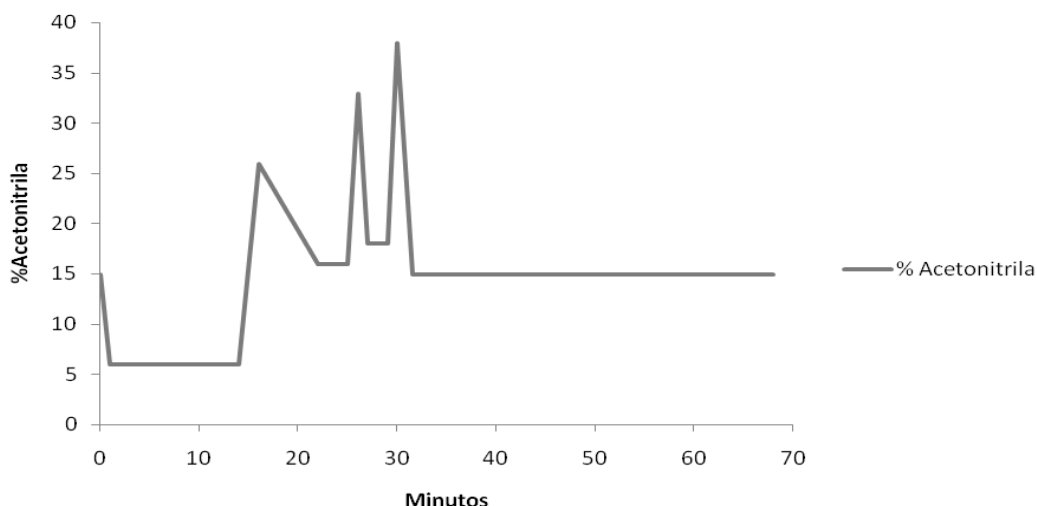


Figura 8. Variação da % de acetonitrila (fase móvel B) durante a corrida cromatográfica

### 2.1.2. Validação do método

O método foi validado para a cerveja utilizando-se os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e de quantificação. Os dados obtidos para a validação foram testados com relação à presença de outliers (teste de JackKnife), normalidade (teste de Ryan-Joiner), Independência dos resíduos (teste de Durbin-Watson), homoscedasticidade (teste de Levene modificado), e o ajuste da regressão por ANOVA para verificação da linearidade. O efeito de matriz foi calculado por comparação pelo teste t. A exatidão foi avaliada pela recuperação média dos pontos analisados. A precisão foi avaliada levando em consideração o desvio padrão relativo e o limite de detecção foi determinado pela avaliação de dez brancos de solvente.

### 2.1.3. Determinação do índice de aminas biogênicas

O índice de aminas biogênicas foi determinado utilizando-se a equação proposta por LORET et al. (2005).

## 2.2. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As amostras de cerveja foram analisadas quanto às características físico-químicas descritas na legislação brasileira (BRASIL, 1997).



### 2.2.1. pH e acidez total

As análises de pH foram realizadas utilizando-se potenciômetro (Digimed DM20, São Paulo, Brasil). As análises de acidez foram realizadas titulando-se a amostra com solução de NaOH 0,1 mol/L, sendo os resultados apresentados em g de ácido láctico/100 mL de amostra (IAL, 2004).

### 2.2.2. Teor alcoólico

O teor alcoólico declarado no rótulo pelo fabricante foi considerado para a realização dos cálculos de extrato original e correlação com teor de aminas.

### 2.2.3. Análises de extrato real

As análises de extrato real foram realizadas por gravimetria. 10 mL de cada amostras foram dispensados em placas de petri previamente secas em estufas e pesadas. As placas com as amostras foram levadas a estufa a  $102 \pm 2$  °C por 2 horas. Após o tempo previsto, as placas eram pesadas e o extrato real calculado através da fórmula abaixo. (IAL, 2004)

$$\text{Extrato real} = \frac{(\text{peso da placa+amostra após estufa} - \text{peso da placa vazia}) \times 100}{\text{Volume de amostra utilizado}}$$

### 2.2.4. Amargor

Para a determinação do amargor, foram adicionados 20 mL de iso-octano, uma gota de octanol e 1 mL de HCl 3 mol/L a 10 mL de amostra em um tubo de centrifuga de 50 mL. Os tubos foram agitados por 15 minutos em agitador mecânico e centrifugados por 15 minutos, 3000 rpm a 0° C. O sobrenadante foi lido em espectrofotômetro a 275 nm, contra um branco de iso-octano. A leitura obtida foi multiplicada por 50, e o amargor reportado em unidades IBU (O resultado deve ser sempre apresentado em 0,5 unidades) (COVENIN, 2001).

### 2.2.5. Cor

A cor foi determinada através da leitura em espectrofotômetro de cada amostra, a 430 nm, contra um branco de água destilada. No caso das cervejas escuras, estas devem ser diluídas (1:10) em água destilada antes de se proceder a leitura. A cor, em unidades EBC, foi obtida através da fórmula abaixo (COVENIN, 2001).

$$\text{Cor} = \frac{\text{Absorbância} \times 12,7 \times 1,97 \times d}{d= 10 \text{ para cervejas escuras, } 1 \text{ para as demais cervejas}}$$

### 2.2.6. Extrato original, aparente e grau de fermentação

O extrato original, extrato aparente e grau de fermentação foram calculados utilizando o software *BeerCalc*, da *Scandinavian School of Brewing* (SSB), utilizando os valores obtidos nas outras análises físico-químicas realizadas (SSB, 2009). O extrato original e o grau de fermentação foram calculados pelas fórmulas abaixo. O extrato aparente foi obtido através de uma tabela, utilizando os valores de extrato real e teor alcoólico.

$$\text{Grau de Fermentação} = \frac{100 \times (\text{Extrato Original} - \text{Extrato Real})}{\text{Extrato Original} \times (1 - (0,005161 \times \text{Extrato Real}))}$$

$$\text{Extrato Original} = \frac{(2,0665 \times \text{teor alcoólico (m/m)} + \text{Extrato Real}) \times 100}{100 + 1,0665 \times \text{teor alcoólico (m/m)}}$$

## 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à ANOVA, sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de confiança. Os teores de aminos foram correlacionados com as características físico-químicas utilizando-se a correlação de Pearson, a 5% de significância. Para o teste de médias foi utilizado o software SAS 9.0 e para o cálculo da correlação foi utilizado o software SigmaStat. Os demais cálculos foram realizados utilizando Excel 2007.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1. AMINAS BIOGÊNICAS EM CERVEJAS

#### 1.1. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA

##### 1.1.1. Linearidade

Baseado em estudos prévios, foi definido uma faixa de aplicação entre 0,2 e 2,0 mg/L para cada uma das aminos, com exceção da putrescina e da agmatina, que estão presentes em quantidade superiores, e para as quais foi utilizada uma faixa de 0,2 a 15,0 mg/L e de 3,0 a 15,0 mg/L, respectivamente (Figura 9).

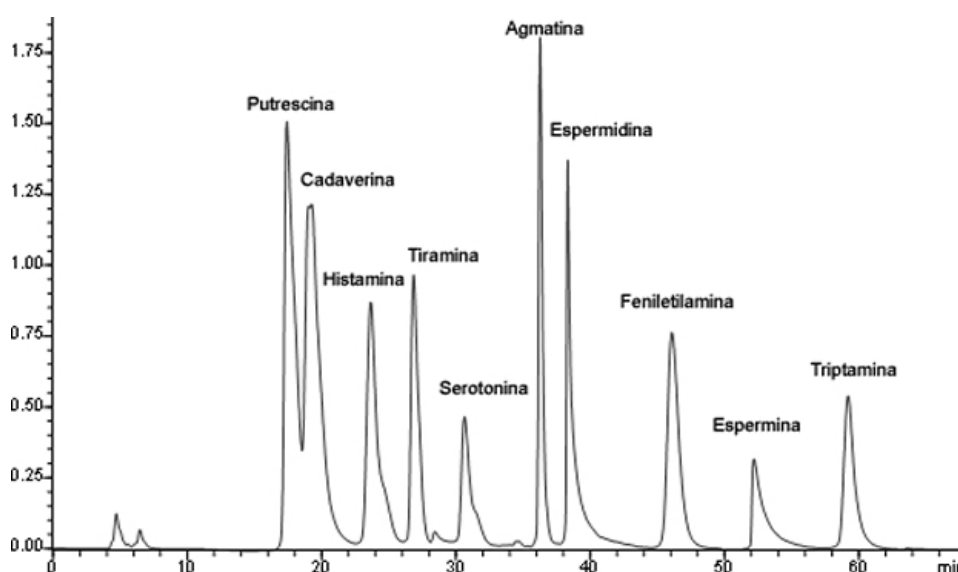


Figura 9. Cromatograma de solução padrão com as 10 aminos analisadas.

Todas as aminos apresentaram resultados satisfatórios para os testes realizados, (Tabela 10) além de valores de coeficiente de correlação -  $r^2$  (valor indicativo do grau de ajuste dos pontos a curva) acima de 0,90 (INMETRO, 2007).

##### 1.1.2. Seletividade

Uma vez que não existem materiais de referências ou amostras brancas para análises de aminos em cervejas, uma amostra comercial foi utilizada como referência (Fig 10).

Tabela 10. Curvas de calibração das dez aminas analisadas com as respectivas equações lineares e coeficiente de correlação

Amina	Equação	r <sup>2</sup>
EPD	$y = 1127494,90x + 98043,82$	0,9979
EPM	$y = 895470,00x - 45013,00$	0,9971
AGM	$y = 1252897,70x + 16408,60$	0,9996
PUT	$y = 3431917,04x + 14542,12$	0,9992
CAD	$y = 4050126,43x + 26353,22$	0,9970
HIM	$y = 1983523,18x + 98490,19$	0,9986
TIM	$y = 1402572,18x + 98490,19$	0,9952
SRT	$y = 987600,00x - 68481,00$	0,9998
TRM	$y = 1341312,34x + 11025,11$	0,9984
FEN	$y = 1879718,11x + 13779,73$	0,9997

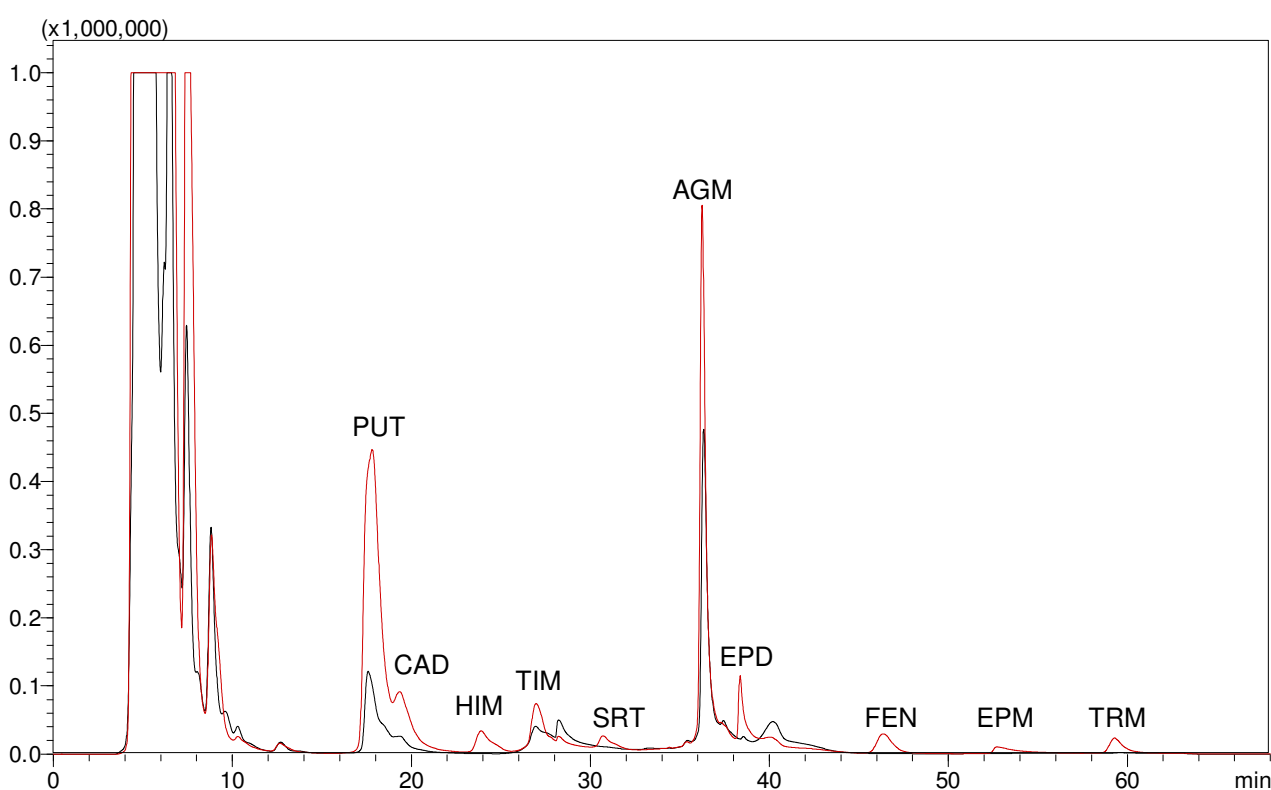


Figura 10. Cromatograma comparativo entre amostra adicionada de padrão contendo as dez aminas analisadas (vermelho) e amostra pura (preto).

PUT – Putrescina, CAD – cadaverina, TIM – Tiramina, HIM – histamina, EPD – espermidina, FEN – Femiletilamina, TRM – triptamina, EPM – espermina, SRT – Serotonina, AGM – Agmatina.

Foram construídas curvas analíticas com concentrações idênticas, em solvente e na amostra referência. Apenas três (histamina, tiramina e serotonina) entre as dez aminas analisadas não apresentaram efeito de matriz (Figura 11), portanto, o restante da validação foi realizado em matriz adicionada, e as análises foram comparadas com curva feita em amostra.

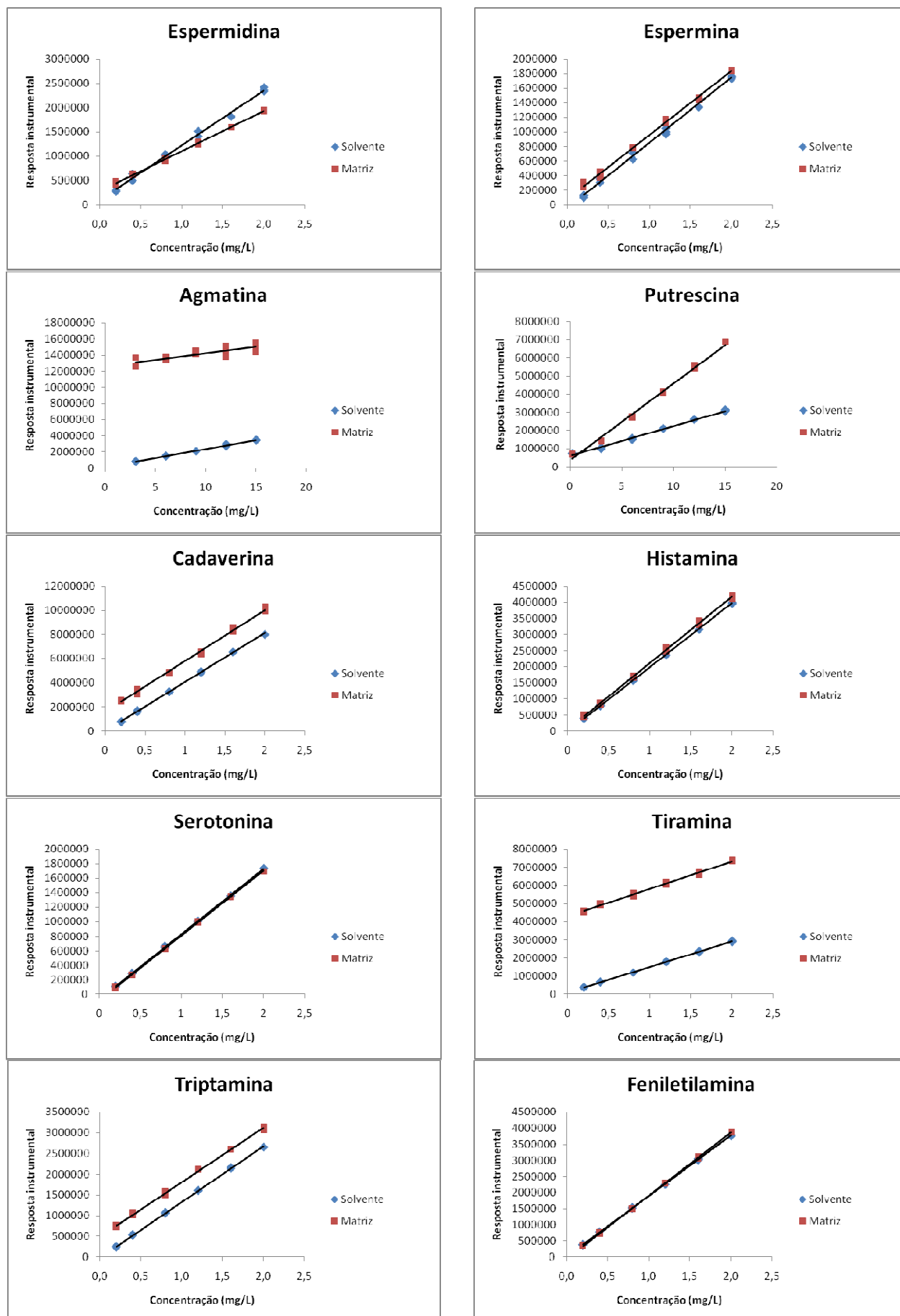


Figura 11. Gráficos de efeito de matriz para as dez aminas analisadas, comparando curvas em solvente com curvas em matriz dos padrões.

### 1.1.3. Precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação

A precisão foi avaliada em função da recuperação aparente, sendo esse limite definido em função da fração de massa do analito a ser detectado. No caso específico das aminas analisadas, elas se encontram em mg/L, ou seja, fração de massa de  $10^{-6}$ . Para tal fração de massa, os valores de recuperação aparente podem variar entre 80 e 110% (EC, 2002). Como a recuperação foi feita utilizando amostras adicionadas e não de um material de referência, não foi possível afirmar que o método é exato, apenas pode-se afirmar que não é inexato para as concentrações testadas.

Os valores do  $DP_R$  (desvio padrão da reprodutividade parcial) e  $DP_r$  (desvio padrão da repetitividade) foram comparados com valores de referência obtidos através da equação de Horwitz ou Thompson, dependendo da fração de massa do analito. Para os analitos estudados, os limites de  $DP_R$  e  $DP_r$  são 16 e 10,7%, respectivamente.

Com base nos resultados obtidos para exatidão e precisão, assim como para o limite de detecção (média + 3 desvios padrões de 10 brancos de solvente), foram estabelecidos os limites de detecção e quantificação do método, mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Limites de detecção e quantificação das aminas analisadas

Aminas	Faixa de Estudo (mg/L)	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
<b>Espermidina</b>	0,2 – 2,0	0,00	0,20
<b>Espermina</b>	0,2 – 2,0	0,21	1,20
<b>Agmatina</b>	3,0 – 15,0	0,11	3,00
<b>Putrescina</b>	0,2 – 15	0,00	0,20
<b>adaverina</b>	0,2 – 2,0	0,02	0,20
<b>Histamina</b>	0,2 – 2,0	0,06	0,40
<b>Tiramina</b>	0,2 – 2,0	0,00	0,20
<b>Serotonina</b>	0,2 – 2,0	0,16	0,40
<b>Triptamina</b>	0,2 – 2,0	0,04	0,40
<b>Feniletilamina</b>	0,2 – 2,0	0,04	0,40

LD – limite de detecção; LQ – Limite de quantificação.

## 1.2. PERFIL DE AMINAS BIOATIVAS EM CERVEJA

### 1.2.1. Perfil de aminos bioativas nas amostras analisadas

Dentre as dez aminos pesquisadas, foram encontradas espermina, agmatina, putrescina, cadaverina e tiramina acima do limite de detecção em 100% das amostras analisadas. (Figura 12).

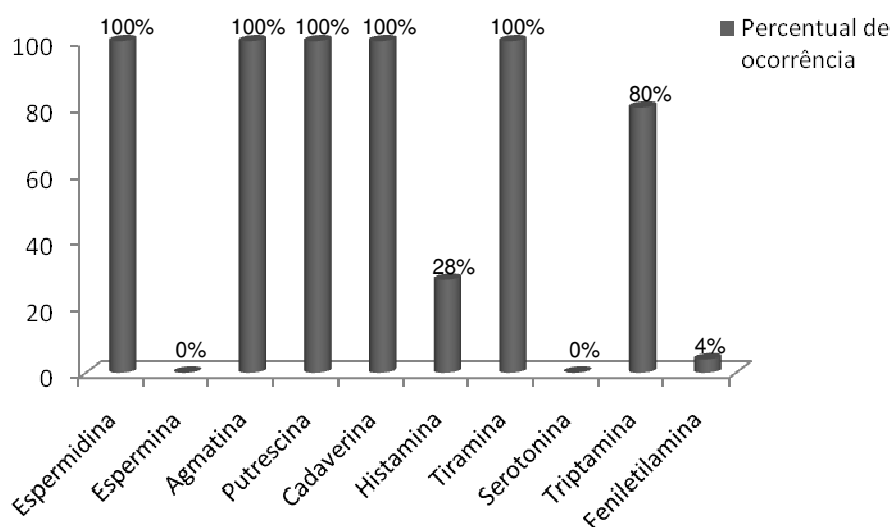


Figura 12. Percentual de ocorrência das dez aminos nas amostras analisadas.

A espermidina é uma amina naturalmente presente na cerveja, devido, principalmente, a sua presença no malte. A espermidina, juntamente com a putrescina e agmatina, fazem parte do grupo das poliaminas, e essas têm sido apontadas como promotoras do crescimento celular, reguladoras do sistema imunológico e, portanto, parte fundamental de qualquer tecido vivo (LARQUÉ et al., 2007).

A tiramina também foi encontrada em 100% das amostras analisadas. Esta amina é encontrada naturalmente na cevada (principal matéria-prima cervejeira), sendo este resultado similar ao descrito por Izquierdo-Pulido et al., (1994), com níveis de tiramina próximos a 2 mg/L. A cadaverina também foi detectada em 100% das amostras analisadas.

Além destas cinco aminos, a presença de histamina, feniletilamina e triptamina também foi detectada. Histamina foi detectada em 28% das amostras analisadas, feniletilamina foi detectada em apenas uma amostra (4%) e a triptamina foi detectada

em 80% das cervejas analisadas. Serotonina e espermina não foram detectadas em nenhuma das amostras analisadas. A ausência dessas aminas em cervejas condiz com a literatura (LORET et al., 2005; IZQUIERDO-PULIDO et al., 1996).

A ausência de serotonina condiz com estudos que analisaram o perfil e os teores de aminas em cevadas e lúpulos cervejeiros. A baixa ocorrência de feniletilamina (detectada em apenas amostra) pode ser explicada pela sua baixa concentração na cevada (variando de traços a 2,30 mg/kg). Espermidina e espermina são as aminas presentes em maiores quantidades na cevada (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993), mas a sua quantidade diminui significativamente durante o processamento, principalmente pela decomposição térmica durante a fase de mosturação, com temperaturas na faixa de 60 – 70 °C (ROMERO et al., 2003). Tal sensibilidade térmica pode explicar os baixos teores de espermina (não detectada em nenhuma amostra) e espermidina (quantificável em 12 das 25 amostras analisadas). Agmatina, putrescina, histamina e triptamina, que também foram detectadas nas amostras analisadas, são encontradas normalmente nas matérias primas cervejeiras (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1993; KALAC et al., 1996; ROMERO et al., 2003).

### **1.2.2. Perfil de aminas bioativas nos diferentes grupos de cerveja**

Espermidina, agmatina, putrescina, cadaverina e tiramina foram encontradas em todas as amostras de todos os grupos analisados. Histamina apresentou-se mais presente no grupo C (42%). Os grupos B e D apresentaram valores menores (28%), e o grupo A, das cervejas de trigo, apresentou 25% de ocorrência de histamina. Além da espermidina, agmatina, cadaverina, putrescina e tiramina, a triptamina também foi detectada em 100% das amostras (Figura 13). Histamina também foi detectada neste grupo em grande percentual das amostras (42% das amostras), sendo este o maior percentual comparado aos demais grupos. Este grupo foi o único no qual feniletilamina foi encontrada em níveis detectáveis.



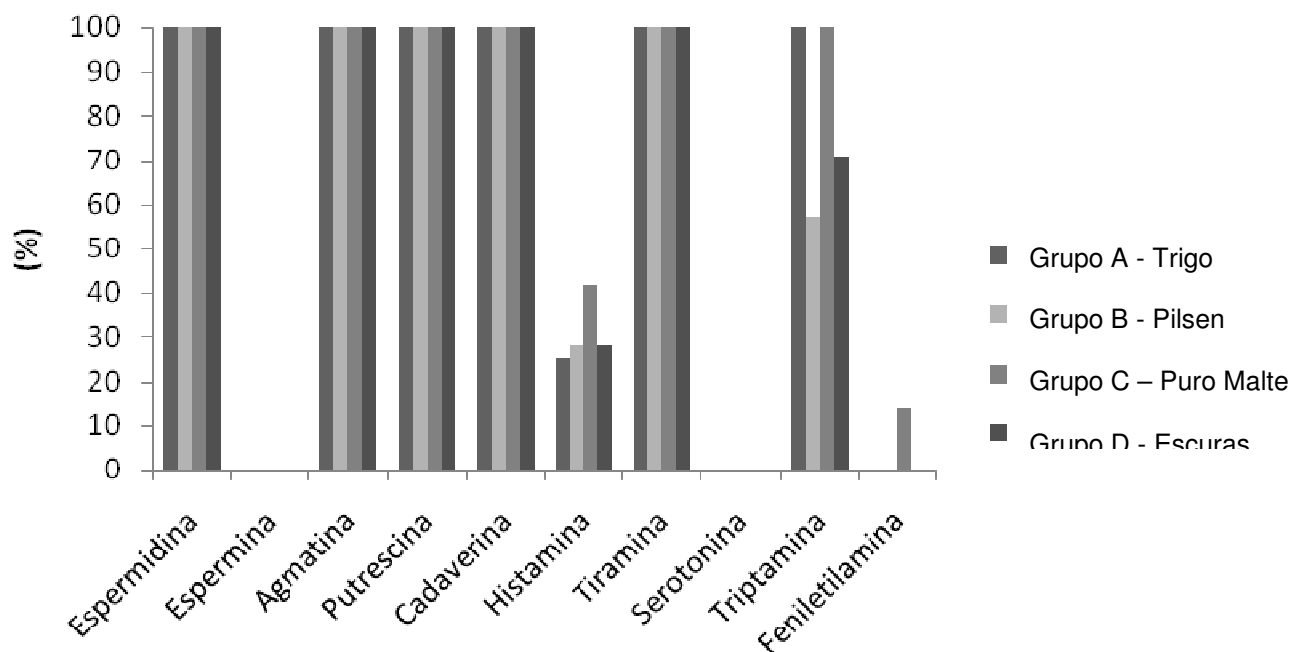


Figura 13. Percentual de ocorrência das aminas nos diferentes grupos de cervejas.

Triptamina também foi detectada em 100% das amostras do grupo A (cervejas de trigo). Este grupo apresentou histamina em apenas uma amostra. O alto índice da presença de triptamina neste grupo e no grupo C pode ser explicado pela sua formulação. Cervejas puro malte e cervejas de trigo não utilizam adjuntos, apenas malte como fonte de açúcares fermentativos (GOLDAMMER, 1999), o que causa um teor de aminas elevados nestas cervejas (GLORIA, 2005). O contrário pode ser observado no grupo B, pois as pilsen produzidas no Brasil normalmente são produzidas com a adição de adjuntos (VENTURINI FILHO, 2000), e este grupo foi o que apresentou a menor ocorrência de histamina (28%) e triptamina (57%).

### 1.3. TEORES DE AMINAS BIOATIVAS EM CERVEJA

Somente cinco das aminas detectadas apresentaram teores de acima do limite quantificação do método. Agmatina, putrescina, cadaverina e tiramina foram quantificadas em 100% das amostras analisadas. Espermidina foi quantificada em 12 das 25 amostras. Histamina, triptamina e feniletilamina estavam presentes em teores abaixo dos seus limites de quantificação (0,4 mg/L para as três aminas). Os teores das aminas encontradas nas amostras analisadas encontram-se na tabela 12.

Tabela 12. Teores de aminas encontrados em amostras de cerveja adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG no período de junho a dezembro de 2008

Amostra		Concentração das aminas (mg/L)						
		EPD	AGM	PUT	CAD	TIM	Total	BAIc
<b>Grupo A</b>	025	0,3	16,8	3,9	0,9	1,1	22,9	0,3
	019	n.q	9,6	3,1	0,4	0,7	14	0,4
	020	n.q	13,3	4	0,6	0,7	18,7	0,4
	013	n.q	10,1	1,7	0,2	0,7	12,9	0,2
<b>Media</b>		0,1 <sup>e</sup>	12,5 <sup>d</sup>	3,2 <sup>a</sup>	0,5 <sup>b</sup>	0,8 <sup>c</sup>	17,1 <sup>f</sup>	0,3 <sup>g</sup>
<b>D.P</b>		n.c	3,33	1,06	0,3	0,2	4,6	0,1
<b>Grupo B</b>	001	n.q	8,7	2,6	0,3	0,6	12,3	0,4
	002	n.q	9,7	2,6	0,4	0,5	13,4	0,3
	003	n.q	11,6	2,5	0,4	0,6	15,2	0,3
	004	0,7	8,9	2,8	0,2	0,6	13,2	0,4
	005	n.q	11,3	2	0,2	0,8	14,4	0,3
	008	n.q	10,1	2	0,3	0,5	12,9	0,2
	015	0,4	8,9	2,4	0,3	0,5	12,5	0,3
<b>Média</b>		0,2 <sup>e</sup>	9,9 <sup>d</sup>	2,4 <sup>a</sup>	0,3 <sup>b</sup>	0,6 <sup>c</sup>	13,4 <sup>f</sup>	0,3 <sup>g</sup>
<b>D.P</b>		0,21	1,18	0,31	0,08	0,11	1,04	0,07
<b>Grupo C</b>	007	0,3	17,8	3,7	0,2	0,9	23	0,3
	014	0,2	11,7	3,5	0,5	0,8	16,7	0,4
	023	0,5	18,9	3,6	0,4	1,3	24,7	0,3
	021	n.q	18,2	2,8	0,4	1,4	22,8	0,2
	009	n.q	10,3	3	0,4	1	14,9	0,4
	006	n.q	8,4	3,5	0,7	1	13,7	0,6
	011	n.q	16,1	3,8	0,7	0,6	21,3	0,3
<b>Média</b>		0,1 <sup>e</sup>	14,5 <sup>d</sup>	3,4 <sup>a</sup>	0,5 <sup>b</sup>	1,0 <sup>c</sup>	19,6 <sup>f</sup>	0,3 <sup>g</sup>
<b>D.P</b>		0,15	4,27	0,37	0,18	0,28	4,4	0,13
<b>Grupo D</b>	016	0,4	7	2,1	0,2	0,6	10,4	0,4
	017	0,2	9,1	1,6	0,2	0,6	11,7	0,2
	018	n.q	10,4	2,4	0,3	0,6	13,8	0,3
	010	0,5	10,4	2,8	0,3	0,5	14,4	0,3
	012	0,5	11,1	3,6	0,5	2,3	18	0,5
	022	n.q	22	4,6	0,8	0,9	28,4	0,3
	024	n.q	15,9	3,1	0,6	0,8	20,4	0,3
<b>Média</b>		0,2 <sup>e</sup>	12,3 <sup>d</sup>	2,9 <sup>a</sup>	0,4 <sup>b</sup>	0,9 <sup>c</sup>	16,7 <sup>f</sup>	0,3 <sup>g</sup>
<b>D.P</b>		0,14	5,07	1	0,23	0,63	6,2	0,1

n.c – não calculado; n.q – não quantificado; D.P – Desvio Padrão; PUT - Putrescina, CAD – Cadaverina, AGM – Agmatina, EPD – Espermidina TIM - Tiramina BAIc – Índice de aminas biogênicas para cervejas. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente (p <0,05).

### **1.3.1. Teores de espermidina**

Espermidina foi encontrada com valores variando de não quantificável a 0,7 mg/L. A literatura é controversa com relação aos teores de espermidina em cervejas. GLORIA e IZQUIERDO-PULIDO (1999) encontraram resultados similares (valores médios de 0,7 mg/L) de espermidina ao analisar cervejas brasileiras. SLOMKOWSKA e AMBROZIAK (2002) e KALAC et al. (2002) encontraram valores mais elevados, entre 2,0 e 9,0 mg/L analisando cervejas do tipo Lager, Stout, Pilsner, Strong e sem álcool. Já DE BORBA e ROHER (2007) e BUIATTI et al. (1995) não detectaram espermidina em suas amostras, ao analisarem cerveja tipo Lager, de trigo e sem álcool.

A discrepância de resultados com relação à espermidina pode ser explicada pela sensibilidade térmica desta amina (KOZOVA et al., 2009; KRAUSOVA et al., 2007). Durante o processamento, o mosto é submetido a um prolongado processo de fervura (VENTURINI FILHO e CEREDA, 1998) e a grande variabilidade dos teores de espermidina pode estar relacionada a diferentes execuções deste processo.

### **1.3.2. Teores de agmatina**

Os teores de agmatina variaram de 7,0 a 22,0 mg/L, sendo estas duas amostras pertencentes ao grupo D. Tal fato pode ser explicado pela utilização de adjuntos durante o processo de fabricação. As amostras 22 e 24 foram produzidas por microcervejarias, e só utilizam malte de cevada para a fabricação de suas cervejas, e por isso apresentaram valores acima das demais amostras (22,0 e 15,9 mg/L, respectivamente). A agmatina presente na cerveja tem sua única origem no malte de cevada e isso pode ser verificado através da correlação entre os teores desta amina e da putrescina (outra amina que tem sua origem na cevada) (LORET et al., 2005), que foi altamente significativo ( $p < 0,001$ ).

### **1.3.3. Teores de putrescina**

Os teores de putrescina variaram de 1,6 a 4,6 mg/L. A amostra 22 (Stout) apresentou o maior teor de putrescina (4,6 mg/L). Os teores de putrescinas na cerveja são geralmente influenciados pela cevada (variedade, germinação, temperatura de secagem) (KALAC e GLORIA, 2009). ANLI et al. (2006), encontraram putrescina variando entre 1 – 6 mg/L ao analisarem cervejas tipo pilsner e lagers. DE BORBA e ROHER (2007) encontraram valores similares para cervejas do tipo Lager (1,9 mg/L),

mas encontraram valores superiores (4,0 – 6,0 mg/L) para cervejas de trigo. IZQUIERDO-PULIDO et al. (1996), KALAC et al. (2002) e ROMERO et al. (2003) também observaram valores maiores que os observados neste trabalho, com teores de putrescina próximos a 15 mg/L para algumas amostras.

Não há na literatura limites ou quantidades consideradas tóxicas para a putrescina, entretanto ela pode potencializar os efeitos da histamina e da tiramina, aminas normalmente presentes em produtos fermentados, e que podem causar envenenamento alimentar.

#### **1.3.4. Teores de tiramina**

A tiramina, indicada como sendo a principal amina causadora de efeitos adversos (KALAC e KRIZEK, 2003), foi encontrada em quantidades quantificáveis, variando entre 0,5 e 2,3 mg/L. Ela está presente naturalmente na cevada, mas ela pode ser formada durante o processamento, principalmente na fermentação e em etapas subseqüentes. Essa formação está associada principalmente a falta de higiene, e a utilização de tecnologias ultrapassadas (ROMERO et al., 2003).

O maior valor foi encontrado em uma amostra do Tipo Stout industrializada (2,3 mg/L). KALAC et al. (2002) encontraram valores de tiramina similares (1,1 mg/L) aos deste trabalho, em uma das três marcas analisadas. As outras duas marcas apresentaram valores maiores, com umas das marcas apresentando teores de 10 mg/L, valor dez vezes acima do que o verificados nas amostras analisadas. GLORIA e IZQUIERDO-PULIDO (1999), verificaram que as cervejas do tipo Stout apresentaram os maiores valores, ao serem analisadas cervejas brasileiras, apesar dos valores encontrados serem maiores ( 0,38 – 36,8 mg/L) que os encontrados neste trabalho, já ANLI et al. (2006) não detectou tiramina em 28 das 30 amostras de cerveja analisadas.

Segundo KALAC e KRIZEK (2003), para pacientes que utilizam IMAO, um consumo de 6 mg de tiramina num período de 4 h, ou uma cerveja que contenha mais que 10 mg/L de tiramina, seriam considerados perigosos para estes pacientes. Considerando a amostra que apresentou o maior teor de tiramina (2,3 mg/L), seriam necessários aproximadamente 3 L de cerveja (5 garrafas de 600 mL) para se atingir o limite de risco. Para pessoas saudáveis, ainda não foram estabelecidos limites de risco. Não foi possível observar diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os teores de aminas encontrados nos diferentes grupos de cervejas analisados.

### 1.3.5. Outras aminas bioativas

No caso da histamina, os valores encontrados ( $< 0,4$  mg/L) indicam bom controle microbiológico das leveduras utilizadas na fermentação em todas as amostras analisadas, pois a presença desta amina em cervejas é normalmente atribuída à contaminação do fermento por bactérias lácticas (DE BORBA e ROHRER, 2007). Valores similares de histamina foram encontrados por GLORIA e IZQUIERDO-PULIDO (1999), em cervejas brasileiras (teor médio de  $0,20$  mg/L), CORTACERO-RAMIREZ et al. (2007) em cervejas da Espanha ( $0,3$  mg/L para cervejas tipo extra,  $0,6$  mg/L para cervejas especiais e  $0,1$  mg/L para cervejas sem álcool), por DE BORBA e ROHRER (2007) em cervejas comercializadas nos Estados Unidos (teores entre  $0,19 - 0,39$  mg/L) e ANLI et al. (2006) em cervejas turcas (teores entre não detectado e  $1,02$  mg/L)

Cadaverina foi encontrada em valores entre  $0,2$  e  $0,9$  mg/L. Os valores encontrados nas cervejas analisadas são condizentes com os valores encontrados em cervejas europeias, com teor médio de  $3,9$  mg/L (IZQUIERDO-PULIDO et al., 1996; SLOMKOWSKA e AMBROZIAK, 2002) e em cervejas brasileiras, com um teor médio de  $0,53$  mg/L (GLORIA e IZQUIERDO-PULIDO, 1999). KALAC et al. (2002), analisando cervejas europeias encontrou valores similares para 2 das 3 marcas analisadas ( $1,7$  e  $0,9$  mg/L). A terceira marca analisada apresentou valores superiores aos demais ( $48,1$  mg/L).

### 1.3.6. Contribuição dos teores de aminas ao teor total

Na figura 14 estão apresentados os percentuais de contribuição da espermidina, agmatina, putrescina, cadaverina e tiramina ao teor total. Agmatina foi a amina presente em maior quantidade em todas as amostras, representando em média  $74\%$  do total de aminas das amostras. A agmatina se apresenta normalmente com valores próximos a  $10$  mg/L (KALAC e KRIZEK, 2003), similares aos encontrados nas amostras brasileiras.

A putrescina foi a segunda amina com maior contribuição para o total de aminas, representando em média  $18\%$  do total de aminas, seguido pela tiramina ( $5\%$ ), cadaverina ( $2\%$ ) e espermidina ( $1\%$ ).

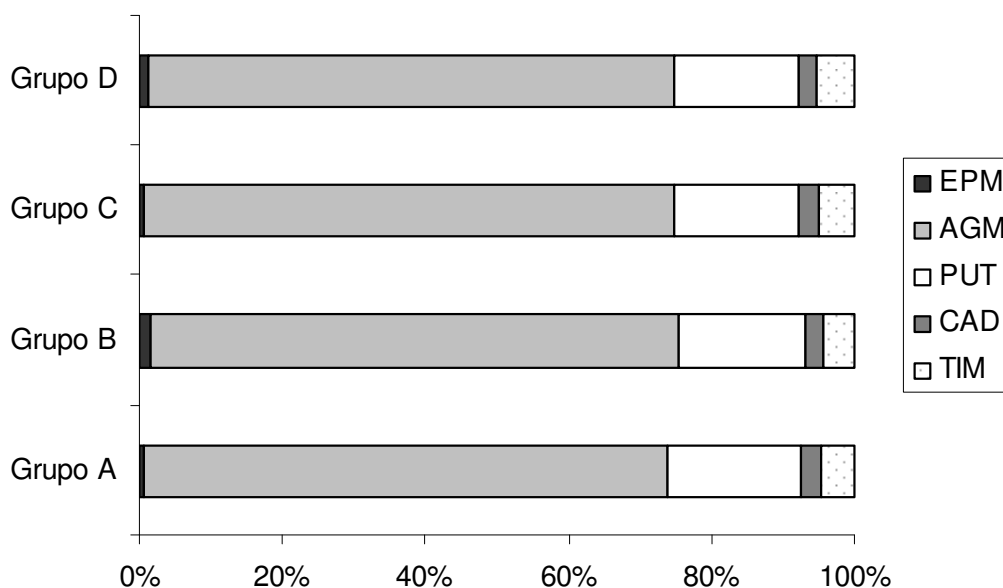


Figura 14. Percentual de contribuição de cada amina para o teor total de aminas encontrados nas amostras analisadas

#### 1.4. ÍNDICE DE AMINAS BIOGÊNICAS PARA CERVEJAS

O índice de aminas biogênicas proposto por LORET et al. (2005) para aminas biogênicas foi calculado para todas as amostras, e os resultados estão plotados no gráfico abaixo (Fig.15). Os valores de BA<sub>lc</sub> variaram entre 0,2 e 0,6, estando todas as amostras dentro da faixa considerada segura com relação à qualidade microbiológica (BA<sub>lc</sub> <1).

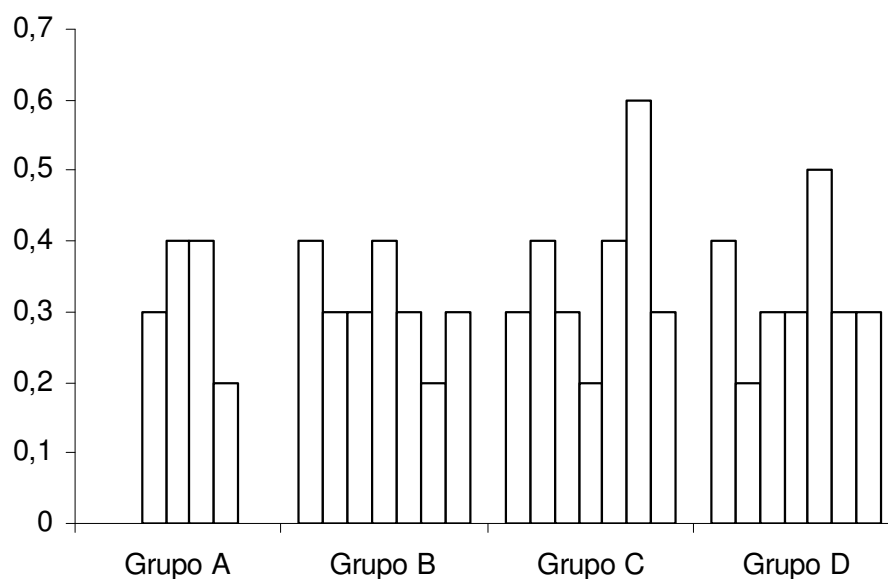


Figura 15. Índice de aminas biogênicas das amostras de cervejas adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de junho a dezembro de 2008.

A maioria das amostras apresentaram valores entre 0,2 e 0,4, e apenas duas amostras apresentaram valores acima desta faixa. Uma das amostras (Stout industrializada) apresentou valor de BA<sub>lc</sub> 0,5. A outra amostra, fabricada de modo artesanal, apresentou BA<sub>lc</sub> 0,6. Os valores elevados dos índices de aminas podem ser indicativos de contaminação na fermentação por bactérias gram-negativas (*Enterobacter* spp., e *Escherichia coli*) (KALAC e GLORIA, 2009).

DE BORBA E ROHRER (2007) também encontraram valores de BA<sub>lc</sub> <1 para as 4 amostras analisadas em seu trabalho; já LORET et al. (2005) encontraram valores entre 0 a 10 para cervejas de alta e baixa fermentação, e algumas amostras acima de 10 para cervejas com fermentação secundária e fermentação espontânea.

## 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DAS AMOSTRAS

Os resultados de todas as análises físico-químicas encontram-se na tabela 13.

### 2.1. pH E ACIDEZ

O pH médio dos grupos variou entre de 4,12 e 4,46. Valores de pH estão condizentes com o descrito por GLORIA e IZQUIERDO-PULIDO (1999), que encontraram valores médios variando entre 4,18 e 4,34 para os diferentes tipos de cervejas analisados.

A acidez média variou entre 0,17 e 0,26 g ácido láctico/100 mL para os grupos analisados. IZQUIERDO-PULIDO et al. (1996) encontraram uma faixa mais ampla de acidez nas amostras analisadas, com valores variando entre 0,10 e 1,04 g ácido láctico/100 mL. Os elevados valores de acidez encontrados neste trabalho se devem principalmente as cervejas de fermentação espontânea (tipo Lambic e Kriek), que não utilizam fermento, e sim os próprios microrganismos presentes na matéria prima para a fermentação, levando assim a uma maior contaminação e maior acidez. Excetuando esses tipo de cerveja, os valores encontrados são similares aos obtidos neste trabalho (0,10 – 0,59 g ácido láctico/100 mL). Na legislação brasileira não existe nenhuma menção para uma acidez máxima ou pH permitidos para cervejas.

Tabela 13. Características físico-químicas das amostras de cervejas adquiridas no mercado consumidor de Belo Horizonte, MG, no período de junho a dezembro de 2008

	pH	Acidez	Cor	T.A	Amargor	E.R	E.O	E.A	G.F
<b>Grupo A</b>	4,55	0,31	66	7,30	33,0	6,21	16,95	3,70	65,44
	4,43	0,27	6	5,60	28,0	4,80	13,24	2,83	65,33
	4,39	0,22	17	5,30	14,0	4,45	12,48	2,57	65,82
	4,48	0,23	16	4,90	13,0	4,05	11,52	2,30	65,50
<b>Média</b>	4,46 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	26 <sup>b</sup>	5,78 <sup>a</sup>	22,00 <sup>a</sup>	4,88 <sup>b</sup>	13,55 <sup>ab</sup>	2,85 <sup>b</sup>	65,52 <sup>a</sup>
<b>D.P</b>	0,07	0,04	27	1,06	10,03	0,94	2,37	0,61	0,21
<b>Grupo B</b>	4,16	0,14	7	4,70	13,0	4,05	11,22	4,05	65,30
	3,98	0,17	7	4,80	11,0	3,91	11,24	3,91	66,57
	4,11	0,18	7	4,70	12,0	4,34	11,49	2,66	63,69
	4,18	0,16	7	4,50	12,0	3,77	10,67	2,16	65,91
	4,18	0,18	7	4,50	9,5	3,91	10,79	2,29	65,10
	4,01	0,17	6	4,40	11,0	4,05	11,66	2,26	66,72
	4,20	0,18	9	4,60	12,0	3,84	10,87	2,18	66,04
<b>Média</b>	4,12 <sup>c</sup>	0,17 <sup>b</sup>	7 <sup>b</sup>	4,60 <sup>b</sup>	11,50 <sup>b</sup>	3,98 <sup>b</sup>	11,13 <sup>b</sup>	2,79 <sup>b</sup>	65,62 <sup>a</sup>
<b>D.P</b>	0,09	0,01	0	0,14	1,12	0,19	0,37	0,83	1,04
<b>Grupo C</b>	4,28	0,18	8	5,00	20,0	3,99	11,60	2,20	67,05
	4,23	0,18	8	5,20	19,5	3,73	11,66	1,87	68,02
	4,35	0,23	11	5,00	23,0	3,64	11,28	1,85	69,02
	4,35	0,23	17	6,60	20,0	6,06	15,82	3,78	63,69
	4,08	0,18	8	5,50	14,0	4,73	12,29	2,95	63,09
	4,56	0,16	50	5,60	26,0	5,06	13,48	3,09	64,13
	4,25	0,22	6	4,80	13,0	4,15	11,46	2,44	65,19
<b>Média</b>	4,3 <sup>ab</sup>	0,20 <sup>ab</sup>	15 <sup>b</sup>	5,39 <sup>ab</sup>	19,36 <sup>ab</sup>	4,48 <sup>b</sup>	12,52 <sup>b</sup>	2,60 <sup>b</sup>	65,74 <sup>a</sup>
<b>D.P</b>	0,15	0,03	15	0,61	4,61	0,87	1,64	0,71	2,30
<b>Grupo D</b>	4,13	0,20	244	4,00	10,0	10,52	16,30	9,18	37,47
	4,23	0,24	420	4,20	10,5	10,09	16,17	8,67	39,68
	4,26	0,22	156	4,30	12,0	9,07	15,35	7,60	42,94
	4,25	0,23	175	4,60	20,0	5,12	13,39	3,19	63,42
	4,29	0,29	203	5,40	17,0	9,69	17,48	7,88	46,91
	4,34	0,36	193	4,30	16,5	6,21	16,95	3,70	65,44
	4,42	0,18	70	4,80	23,0	4,54	11,83	2,83	63,11
<b>Média</b>	4,2 <sup>bc</sup>	0,25 <sup>ab</sup>	208 <sup>a</sup>	4,51 <sup>b</sup>	15,57 <sup>ab</sup>	7,89 <sup>a</sup>	15,35 <sup>a</sup>	6,15 <sup>a</sup>	51,28 <sup>b</sup>
<b>D.P</b>	0,09	0,06	107	0,47	4,95	2,52	2,04	2,78	12,26

Valores médios na mesma coluna com mesma letra não diferem significativamente (Teste de Tukey,  $p < 0,05$ )

D.P – Desvio Padrão; T.A – Teor Alcoólico; E.R – Extrato Real; E.O – Extrato Original; E.A – Extrato Aparente; G.F – Grau de Fermentação.



## **2.2. TEOR ALCOÓLICO**

O teor alcoólico (%v/v) médio dos grupos variou entre 4,51 e 5,78%. Estes valores foram obtidos através das informações dos rótulos, pois, de todos os parâmetros físico-químicos exigidos pela legislação, este é o único que deve ser obrigatoriamente declarado no rótulo do produto (BRASIL, 1997).

## **2.3. COR**

A cor dos grupos analisados variou entre 7 e 208 unidades EBC. O grupo das cervejas escura apresentou cor significativamente maior que os demais grupos analisados. Entre os grupos A, B e C não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ). Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 1997) as cervejas são classificadas como claras ( $EBC < 20$ ) ou escuras ( $EBC > 20$ ). Todas as amostras analisadas estavam de acordo com o exigido. Resultados similares foram encontrados por SLEIMAN (2006), que analisou cervejas tipo pilsen provenientes das regiões sudeste do Brasil, encontrando um valor médio de  $6 \pm 0,9$  unidades EBC.

## **2.4. AMARGOR**

O amargor das amostras variou entre 9,5 e 33 IBU. SLEIMAN (2006) encontrou valores entre 6 e 44 IBU analisando cervejas comercializadas na região sudeste. Ainda segundo este autor, é possível verificar uma diminuição do amargor das cervejas produzidas no Brasil, principalmente devido ao aumento do consumo de cerveja pelo público feminino. A legislação brasileira não possui classificação sobre o amargor das cervejas aqui comercializadas, pois o amargor está relacionado diretamente com a aceitação e preferência do consumidor, e adição de lúpulo traz poucas mudanças no processo de produção da cerveja (VENTURINI FILHO, 2000).

## **2.5. EXTRATO ORIGINAL**

As amostras analisadas apresentaram percentuais de extrato original entre 10,67 e 16,95%. De acordo com a classificação exigida pela legislação brasileira, apenas uma amostra apresentou extrato original abaixo do recomendado, pois para as cervejas do tipo Extra, o extrato original deve variar de 12,5 a 14,0%, e a amostra apresentou um valor de 12,3%.

IZQUIERDO-PULIDO et al. (1996) encontraram valores similares ao descritos neste trabalho, mas também encontrou valores mais elevados para algumas amostras (7,9 – 23,0 %). Possivelmente estas diferenças podem ser explicadas por variações tecnológicas (maior utilização de malte).

## **2.6. EXTRATO APARENTE E REAL**

Os percentuais de extrato real e aparente são medidas da gravidade específica da cerveja e foram transformados em °P (graus Plato) ou porcentagem. A única diferença entre eles é a correção feita pela alteração de densidade causada pelo etanol presente na bebida, que é feita no extrato real.

Os percentuais de extrato real variaram entre 3,64 e 10,52%, sendo o grupo das cervejas escuras o que apresentou os maiores valores, assim como os maiores valores de extrato aparente, que variaram entre 1,85 e 9,18%. Os resultados acima do esperado para as amostras escuras podem ser explicados pela adição de corante caramelo a essas amostras, que aumentaria o teor de sólidos solúveis, aumentando assim os valores do extrato aparente e real.

SLEIMAN (2006) encontrou valores similares aos observados neste trabalho (valor médio de  $3,9 \pm 0,3\%$  para extrato real e  $2,3 \pm 0,3\%$  para extrato aparente), com exceção de algumas amostras do grupo D, com extrato real variando entre 3,5-4,5%, já o extrato real difere, pois os valores encontrados foram maiores do que os descritos por este autor.

## **2.7. GRAU DE FERMENTAÇÃO**

O grau de fermentação das cervejas analisadas variou de 37,47 a 69,02%. Segundo NIELSEN e ERDAL (2005), as cervejas apresentam grau de fermentação entre 65 e 85%. As amostras do grupo das cervejas escuras apresentaram um grau de fermentação abaixo do esperado, provavelmente devido à adição de corante caramelo a essas amostras, que confere a coloração escura. O corante causa um aumento no extrato real da cerveja e, conseqüentemente, uma diminuição no grau de fermentação.

### 3. CORRELAÇÃO ENTRE AMINAS E CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

A partir dos resultados obtidos com as análises físico-químicas e das aminas foi estabelecido o coeficiente de correlação de Pearson. Os resultados estão na tabela 14.

Tabela 14. Correlação entre aminas e características físico-químicas das amostras

	Putrescina	Cadaverina	Tiramina	Agmatina	Espermidina	Total	BAlc
<b>pH</b>	0,030	0,006	0,081	0,080	0,650	0,013	0,041
<b>Acidez</b>	0,025	0,016	0,024	0,011	0,923	0,001	0,079
<b>Cor</b>	0,419	0,618	0,595	0,570	0,343	0,732	0,390
<b>Teor alcoólico</b>	0,041	0,009	0,009	0,116	0,663	0,017	0,065
<b>Amargor</b>	0,004	0,002	0,047	0,047	0,879	0,005	0,070
<b>Extrato Real</b>	0,444	0,796	0,138	0,419	0,478	0,762	0,046
<b>Extrato Original</b>	0,352	0,136	0,013	0,390	0,851	0,117	0,025
<b>Extrato Aparente</b>	0,182	0,414	0,304	0,153	0,456	0,301	0,134
<b>Grau de Fermentação</b>	0,074	0,212	0,577	0,361	0,433	0,148	0,135

p-valor obtido pela correlação de Pearson, 95% de confiança, BAlc – Índice de aminas biogênicas para cerveja

O amargor e a acidez foram os parâmetros que se correlacionaram com maior número de aminas. A acidez correlacionou-se com todas as aminas, exceto com a espermidina e com o total de aminas. Tais correlações eram esperadas pois a acidez é um fator fundamental na formação de aminas. Segundo SILLA SANTOS (1996), o pH ótimo de ação das enzimas aminoácido descarboxilase é na faixa de 4,0 – 5,5, coincidindo com o pH das amostras.

O teor alcoólico se correlacionou com putrescina, cadaverina, tiramina. O teor alcoólico é dependente da fermentação, e a correlação entre este parâmetro e as aminas pode indicar a formação dessas aminas durante a fermentação.

O amargor correlacionou com todas as aminas (exceto espermidina) e com o total de aminas. Esta correlação não era esperada, pois o amargor é resultado da adição de lúpulo à cerveja, e este é adicionado em quantidade muito pequena em relação à quantidade total de matéria prima utilizada (SLOMKOWSKA e AMBROZIAK, 2002). Tal fato pode ser explicado pela presença de enzimas aminoácido-descarboxilase no lúpulo, que poderiam levar à formação de aminas durante o processamento.

O extrato original correlacionou se com o BAIC. Tal fato era esperado, pois as aminas formadas durante o processo de fabricação da cerveja entram no numerador da fórmula do BAIC, e esses parâmetros estão relacionados com a quantidade de matéria prima, quanto maior quantidade de matéria prima, mais provável será o surgimento dessas aminas. A tiramina também se correlacionou com o extrato original, sendo esta amina também formada durante o processamento.

A acidez, o teor alcoólico e o amargor foram os parâmetros que se correlacionaram positivamente com os teores de aminas, demonstrando que esses parâmetros devem ser considerados pontos críticos durante o processo de fabricação, e devem ser controlados para que os teores das aminas nas cervejas mantenham em níveis seguros ao consumidor.

Também foi calculada a correlação entre as aminas analisadas, visando identificar as que são influenciadas pelos mesmos fatores. Os resultados se encontram na tabela abaixo (Tabela 15).

Tabela 15. Correlação entre os teores de aminas das amostras analisadas

	<b>Putrescina</b>	<b>Cadaverina</b>	<b>Tiramina</b>	<b>Agmatina</b>	<b>Espermidina</b>	<b>Total</b>
<b>Cadaverina</b>	<0,001					
<b>Tiramina</b>	0,036	0,133				
<b>Agmatina</b>	<0,001	0,004	0,075			
<b>Espermidina</b>	0,994	0,153	0,260	0,257		
<b>Total</b>	<0,001	0,001	0,017	<0,001	0,470	
<b>BAIC</b>	0,092	0,136	0,044	0,061	0,111	0,338

p-valor obtido pela correlação de Pearson, 95% de confiança

As correlações entre agmatina, putrescina, cadaverina e tiramina indicam que possivelmente estas aminas derivam do malte ou são formadas a partir de substâncias presentes nele, uma vez que a única fonte de agmatina na cerveja é o malte, ou elas sofrem influências dos mesmos fatores para a sua formação durante o processo de fabricação.

## CONCLUSÕES

Espermidina, agmatina, putrescina, cadaverina e tiramina foram encontradas em todas as amostras de cervejas analisadas. Agmatina foi a amina predominante, com teores variando entre 7 e 22 mg/L, seguida pela putrescina (1,6 – 4,6 mg/L), tiramina (0,6 – 2,3 mg/L), cadaverina (0,2 – 0,9 mg/L) e espermidina (não quantificável – 0,7 mg/L). Histamina, feniletilamina e triptamina foram detectadas em 28%, 80% e 4% das amostras, respectivamente, mas todas apresentaram teores abaixo do limite de quantificação (0,4 mg/L). Serotonina e espermina não foram detectadas em nenhuma amostra. Os teores de tiramina que poderiam causar efeito adverso à saúde estão abaixo dos níveis considerados críticos para os consumidores.

Todas as exigências da legislação brasileira sobre as características físico-químicas das cervejas nacionais foram cumpridas, e os valores obtidos se mostraram condizentes com os obtidos por outros pesquisadores brasileiros, com exceção de uma amostra, que apresentou o extrato original ligeiramente abaixo do especificado.

A acidez, o teor alcoólico e o amargor foram os parâmetros que se correlacionaram positivamente com os teores de aminas, indicando que esses parâmetros influenciam na formação de aminas. Foi verificada também correlação entre as aminas, o que pode indicar que elas têm a mesma origem ou são influenciadas pelos mesmos fatores durante sua formação.

A partir do perfil e dos teores de aminas encontradas nas amostras analisadas, foi possível constatar que as cervejas podem ser consumidas mesmo por aquelas pessoas que fazem uso de medicamentos que inibem a ação das monoaminoxidases, devido aos baixos teores de aminas biogênicas.

A qualidade microbiológica destas amostras também se encontra em nível considerado excelente, verificado pelo BA<sub>lc</sub> – Índice de aminas em cerveja, que foi menor que 1 para todas as amostras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANCIN-AZPILICUETA, M.; GONZALEZ-MARCO, A.; JIMENEZ-MORENO, N. Current knowledge about the presence of amine in wines. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, n. 48, p. 257-275, 2008.
- ANLI, R. E.; VURAL, N.; DEMIRAY, S.; MERT, B. Biogenic Amine Content of Beers Consumed in Turkey and Influence of Storage Conditions on Biogenic Amine Formation. **J. Inst. Brew.**, v. 112, n. 3, p. 267–274, 2006.
- BAMFORTH, C.W. Beer: an ancient yet modern biotechnology. **Chem. Educator**, v. 5, p. 102-112, 2000.
- BAMFORTH, C.W. Nutritional aspects of beer – a review. **Nutr. Res.**, v. 22, p. 227-237, 2002.
- BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, p. 341-346, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997. **Diário oficial da União**. Brasília, 1997.
- BUIATTI, S.; BOSCHELLE, O.; MOZZON, M.; BATISTUTTA, F. Determination of biogenic amines in alcoholic and non alcoholic beers by HPLC. **Food Chem.**, v. 52, n. 4, p. 199-202, 1995.
- CEREDA, M.P. Cervejas. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. *Biotecnologia - Alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. v. 5. Edgard Blücher: São Paulo, 1985. 227p.
- CEREDA, M.P.; VENTURINI FILHO, W.A. Cerveja. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*. v. 4 – Biotecnologia na produção de alimentos. Edgard Blücher: São Paulo, 2005. 523p.
- CORTACERO-RAMIREZ, S.; ARRAÉZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Determination of biogenic amines in beer and

brewing process samples by capillary electrophoresis coupled to laser-induced fluorescence detection. **Food Chem.**, n. 100, p. 383-389, 2007.

CORTACERO-RAMIREZ, S.; CASTRO, M.H.B.; SEGURA-CARRETERO, A.; CRUCES-BLANCO, C.; FERNANDEZ-GUTIÉRREZ, A. Analysis of beer components by capillary electrophoresis methods. **Trends Anal. Chem.**, v. 22, n. 7, p. 440-445, 2003.

COVENIN. 2616:2001: Malta y cerveza. **Métodos de ensayo**. 2. ed. Venezuela, 2001. 40 p.

DE BORBA, B.M.; ROHRER, J.S. Determination of biogenic amines in alcoholic beverages by ion chromatography with suppressed conductivity detection and integrated pulsed amperometric detection. **J. Chromatogr. A.**, n. 1155, p. 22-30, 2007.

EC (European Commission), Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, L221/8, 2002.

FIX, G.J. *Principles of Brewing Science*. Brewers Publications, 1999. 190p.

GLORIA, M.B.A. Bioactive amines. In H. Hui, L.L. Nollet. Handbook of Food Science, Technology and Engineering. Ed. Marcel Dekker, v.4, p.1-38, 2005.

GLORIA, M.B.A.; IZQUIERDO-PULIDO, M. Levels and significance of biogenic amines in Brazilian beers. **J. Food Comp. Anal.**, v. 12, n. 2, p. 129-136, 1999.

GLORIA, M.B.A.; VIEIRA, S.M. Technological and toxicological significance of bioactive amines in grapes and wines. **Food**, v. 1, n. 2, p. 258–270, 2007.

GOLDAMMER, T. The Brewers' Handbook. KVP Publishers: Virginia, 1999. 456p.

HALASZ, A.; BARATH, A.; HOLZAPFEL, W.H. The biogenic amine content of beer; the effect of barley, malting and brewing on amine concentration. **Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.**, v. 208, p. 418-423, 1999.

- IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 4 *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. 3. ed. São Paulo: IMESP, 2004. 1004p.
- INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. 2007. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ CGCRE-008. Revisão: 02 Junho/2007, 25p.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.; FONT-FABREGAS, J.; VIDAL-CAROU, M.C. Effect of tyrosine on tyrimane formation during beer fermentation. **Food Chem.**, n. 70, v.3, p. 329-332, 2000.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.; FONT-FABREGAS, J.; VIDAL-CAROU, M.C. Influence of *Saccharomyces cerevisiae* var. *uvarum* on histamine and tyramine formation during beer fermentation. **Food Chem.**, n. 54, p. 51-54, 1995.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.; HERNANDEZ-JOVER, T.; MARINE-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M.C. Biogenic amines in European beers. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, p. 3159-3163, 1996.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. Biogenic amines formation during malting and brewing. **J. Food Sci.** v. 59, p. 1104-1107, 1994.
- IZQUIERDO-PULIDO, M.; MARINÉ-FONT, A.; VIDAL-CAROU, M. C. Determination of biogenic amines in beers and their raw materials by ion-pair liquid chromatography with postcolumn derivatization. **J. AOAC Int.** v. 76, p. 1027–1032, 1993.
- JUDICE, F.T. Parâmetros de controle para obtenção da qualidade e estabilidade da cerveja. Belo Horizonte: Centro Universitário de Belo Horizonte, 2007, 35p. (Monografia de graduação em Engenharia de Alimentos).
- KALAC, P.; GLORIA, M. B. A. Biogenic amines in cheeses, wines, beers and sauerkrat. In: DANDRIFOSSE, G. Biological Aspects of biogenic amines, polyamines and conjugates
- KALAC, P.; KRIZEK, M. A review of biogenic amines and polyamines in beer. **J. Inst. Brew.**, v. 109, n. 2, p. 123–128, 2003.



- KALAC, P.; SAVEL, J.; KRIZEK, M.; PELIKANOVA, T.; PROKOPOVÁ, M. Biogenic amines formation in bottled beer. **Food Chem.**, v. 79, p. 431-434, 2002.
- KALNIN, J.L. Avaliação estratégica para a implantação de pequenas cervejarias. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1999, 115p. (Dissertação de mestrado em Engenharia de Produção e Sistemas).
- KOZOVA, M.; KALAC, P.; PELIKANOVA, T. Changes in the content of biologically active polyamines during beef loin storage and cooking. **Meat Science**. v. 81, p. 607-611, 2009.
- KRAUSOVA, P.; KALAC, P.; KRIZEK, M.; PELIKANOVA, T. Changes in the content of biologically active polyamines during storage and cooking of pig liver. **Meat Science**. v. 77, p. 269-274, 2007.
- LARQUÉ, E.; SABATER-MOLINA, M.; ZAMORA, S. Biological significance of dietary polyamines. **Nutrit.**, v. 23, p. 87-95, 2007.
- LASEKAN, O.O.; LASEKAN, W.O. Biogenic amines in traditional beverages produced in Nigeria. **Food Chem.**, v. 69, n. 3, p. 267-271, 1999.
- LIMA, A.S.; GLÓRIA, M.B.A. Aminas bioativas em alimentos. **Bol. SBCTA**, v. 33, n. 1, p. 70-79, 1999.
- LINKO, M.; HAIKARA, A.; RITALA, A.; PENTTILÄ, M. Recent advances in the malting and brewing industries. **J. Biotechnol.**, v. 65, p. 85-98, 1998.
- LORET, S.; DELOYER, P.; DANDRIFOSSE, G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: data from Belgian samples. **Food Chem.**, v. 89, n. 4, p. 519-525, 2005.
- LOUKOU, Z.; ZOUTOU, A. Comparative survey of the simultaneous ultraviolet and fluorescence detection in the RP-HPLC determination of dansylated biogenic amines in alcoholic beverages. **Cromatogr.**, v. 58, p. 579-585, 2003.
- LOUVAND-FUNEL, A. Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. **Microbiol. Lett.**, v. 199, p. 9-13, 2001.

- MIETZ, L.J.; KARMAS, E. Polyamine and histamine content of rockfish, salmon, lobster, and shrimp as an indicator of decomposition. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, v. 61, n. 1, p. 139-145, 1978.
- MONTANARI, L.; FLORIDI, S.; MARCONI, O.; TIRONZELLI, M.; FANTOZZI, P. Effects of mashing procedures on brewing. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 221, p. 175-179, 2005.
- NIELSEN, H.; ERDAL, K. The degree of fermentation. **Scandinavian brewers review**. v. 63, n. 3, p. 34-39, 2005.
- ONAL, A. A review: current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. **Food Chem.**, v. 103, n. 4, p. 1475-1486, 2007.
- PINTO, R.J.P. A utilização da programação linear em uma microcervejaria. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2004. (Monografia de graduação em Engenharia de Produção).
- PROESTOS, C.; LOUKATOS, P.; KOMAITIS, M. Determination of biogenic amines in wine by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. **Food Chem.**, v. 106, p. 1218-1224, 2008.
- ROMERO, R.; BAGUR, M.G.; SÁNCHEZ-VIÑAS, M.; GÁZQUEZ, D. Influence of the brewing process on the formation of biogenic amines in beers. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 376, p. 162-167, 2003.
- SHALABY, A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. **Food Res. Int.**, v. 29, n. 7, p. 675-690, 1996.
- SILLA-SANTOS, M.H. Biogenic amines: their importance in foods. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 29, n. 2-3, p. 213-231, 1996.
- SILVA, J.B.A. **Cerveja**. In: Venturini Filho, G.W. Tecnologia de Bebidas. Edgar Blucher: São Paulo, 2005. 550p.
- SILVEIRA, N.F.A.; LEITAO, M.F.F.; BALDINI, V.L.S.; TEIXEIRA FILHO, A.R. Bactérias produtoras de histamina e potencial para sua formação em peixes de origem fluvial e lacustre. **Braz. J. Food. Technol.**, n. 4, p. 19-25, 2001.

SINDICERV < [www.sindicerv.com.br](http://www.sindicerv.com.br) > Acesso em 02-10-2007.

SLEIMAN, M. Determinação do percentual de malte de cevada em cervejas tipo pilsen utilizando os isótopos estáveis do carbono ( $\delta^{13}C$ ) e do nitrogênio ( $\delta^{15}N$ ). Botucatu: Universidade Estadual Paulista, 2006. (Tese de doutorado em Agronomia)

SLOMKOWSKA, A.; AMBROZIAK, W. Biogenic amines profile of the most popular polish beers. **Eur. Food. Res. Technol.**, n. 215, p. 380-383, 2002.

SSB (Scandinavian School of Brewing) < [www.beercalc.com](http://www.beercalc.com) >. Acesso em 03-jun-09.

VENTURINI FILHO, W.G. **Tecnologia de cerveja**. Funep: Botucatu, 2000. 83p.

VENTURINI FILHO, W.G.; CEREDA, M.P. Hidrolisado de fécula de mandioca como adjunto de malte na fabricação de cerveja: avaliação química e sensorial. **Ciênc. Technol. Aliment.** v.18, n.2, p. 156-161, 1998.

VINOGRADOV, E.; BOCK, K. Structural determination of some new oligosaccharides and analysis of the branching pattern of isomatoooligosaccharides from beer. **Carb. Res.**, v. 309, p. 57-64, 1998.