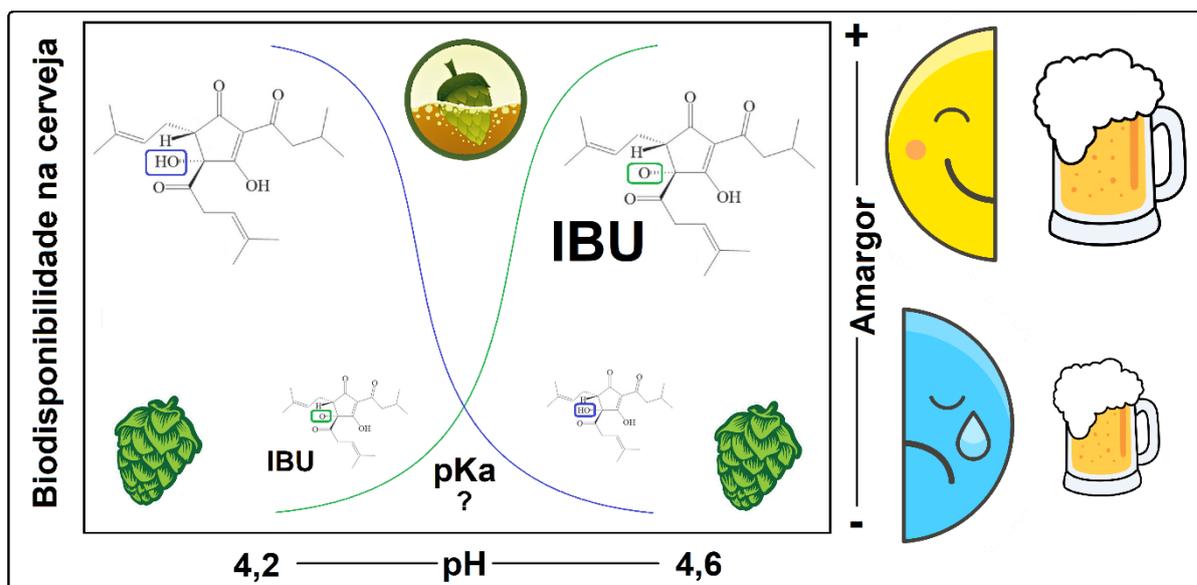


GRAPHICAL ABSTRACT

Aumento da percepção sensorial do amargor de cervejas lupuladas através do ajuste do pH durante a etapa de maturação

INCREASED SENSORY PERCEPTION OF BITTERNESS IN HOPPED BEERS THROUGH PH ADJUSTMENT DURING THE MATURATION STAGE

Thamiriz Caliarri Matos ¹  e Juliano Souza Ribeiro ¹ *

¹ Coordenadoria do Mestrado Profissional em Química em Rede Nacional – Profqui, Instituto Federal do Espírito Santo – Campus Vila Velha, 29106-010 Vila Velha – ES, Brasil

* (julianoribeiro@ifes.edu.br)

Artigo submetido em 30/06/2024, aceito em 03/04/2025 e publicado em 26/05/2025.

ORCID  – Thamiriz C. Matos: <https://orcid.org/0009-0007-6660-2759>

ORCID  – Juliano S. Ribeiro: <https://orcid.org/0000-0002-5685-7551>

Resumo: O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo e com a popularização das chamadas cervejas artesanais, a qualidade final desta bebida passou a ser almejada por mestres cervejeiros e consumidores. Um dos estilos que mais se popularizou no Brasil e no mundo foi a India Pale Ale, ou simplesmente, IPA, cerveja esta, que tem como característica central seu elevado amargor (*International Bitterness Unit* - IBU) causado pela presença das iso-humulonas provenientes dos lúpulos adicionados na receita. Neste trabalho são apresentados resultados espectrofotométricos sobre a importância do pH na solubilidade das iso-humulonas (iso- α -ácidos) em cerveja, e conseqüentemente, intensificando seu amargor. Por isso, introduzimos os termos “IBU teórico” e “IBU real” para a discussão dos resultados apresentados. Os resultados obtidos indicam que um pequeno incremento no pH de cervejas, com pH entre 4,0 e 4,5, no início da maturação pode intensificar o seu amargor, minimizando a diferença existente entre a percepção sensorial do amargor e seu valor teórico de IBU.

Palavras-chave: Iso-humulonas; iso- α -ácidos; pK_a; IBU.

Abstract: Brazil is the third largest beer producer in the world and with the popularization of so-called craft beers, the final quality of this drink has become desired by brew masters and consumers. One of the styles that became most popular in Brazil and around the world was India Pale Ale, or simply, IPA, a beer whose central characteristic is its high bitterness (International Bitterness Unit - IBU) caused by the presence of iso-humulones from hops added to the recipe. In this work, spectrophotometric results are presented on the importance of pH in the solubility of iso-humulones (iso- α -acids) in beer, and consequently, intensifying its bitterness. Therefore, we introduced the terms “theoretical IBU” and “real IBU” to discuss the results presented. The results obtained indicate that a small increase in the pH of beers, with pH between 4.0 and 4.5, at the beginning of maturation can intensify their bitterness, minimizing the difference between the sensorial perception of bitterness and its theoretical IBU value.

Keywords: Iso-humulones; iso- α -acids; pK_a; IBU.

1 INTRODUÇÃO

1.1. CERVEJAS ARTESANAIS E SEUS INGREDIENTES

Desde que as cervejas artesanais ou *craft beers* caíram no gosto mundial e também do povo brasileiro, diversos estilos passaram a fazer parte de suas rotinas. Segundo o Guia de Estilos *Beer Judge Certification Program* (BJCP, 2021) existem mais de 180 estilos de cervejas espalhados pelo mundo. Este número surpreendente de estilos ocorre devido a milenaridade da bebida que evoluiu ao longo dos séculos, apresentando uma ampla variedade de sabores, aromas e cores. O que torna a cerveja artesanal tão única é a atenção especial a escolha dos ingredientes, juntamente aos conhecimentos sobre detalhes técnicos, científicos de sua fabricação e por fim, a capacidade inventiva de cada mestre cervejeiro.

De forma geral, uma cerveja pode conter diversos ingredientes, porém, por maior que seja a lista deles e suas combinações, existem 4 ingredientes fundamentais que não podem faltar em nenhuma receita de cerveja. A lei de Pureza alemã, *Reinheitsgebot*, promulgada em 23 de abril de 1516, pelo Duque Guilherme IV da Baviera, descreve 3 deles de forma bem direta: (i) Água, (ii) malte de cevada e (iii) lúpulo. A levedura, o quarto ingrediente fundamental, ainda não era conhecida naquela época.

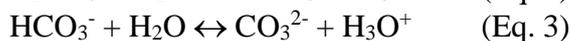
A química e/ou bioquímica envolvidas na utilização correta de cada um desses ingredientes é vasta e não caberia de forma satisfatória em um artigo científico, sendo dividida, na maioria das vezes, em livros distintos e mundialmente famosos (PALMER & KAMINSKI, 2021; MALLETT, 2021; HIERONYMUS, 2020; WHITE & ZAINASHEFF, 2020). Dentro destes ingredientes ainda, existem inúmeros fatores que podem ser compreendidos e analisados (pH do mosto, temperaturas da rampa de sacarificação, tempo de fermentação, descanso do diacetil, adição de lúpulos, etc).

1.2. PH DO MOSTO CERVEJEIRO

O pH (potencial hidrogeniônico) inventado pelo Dinamarquês Soren Peder Lauritz Sorensen em 1909 (SORENSEN, 1909) e foco central deste trabalho, desempenha um papel importantíssimo em diversas etapas do processo de fabricação da cerveja. É por este motivo que entender a faixa de pH correta para a infusão de malte em água, mosturação ou sacarificação, fervura, fermentação e maturação é um caminho sinuoso, porém, fundamental para se obter uma cerveja de excelência.

O mosto cervejeiro é considerado um ambiente tamponado, onde as características da água e do malte utilizados são combinadas formando condições ideais para o processo de sacarificação e, conseqüentemente, um melhor rendimento das reações envolvidas. Em outras palavras, a qualidade da cerveja é diretamente ligada ao controle de temperatura do mosto que ocorre em intervalos precisos de pH, pois a atividade enzimática e suas condições favoráveis resultam em um bom desempenho da mostura. É por este motivo que o pH da mostura é considerado mais importante que apenas o pH da água utilizada (PALMER & KAMINSKI, 2021).

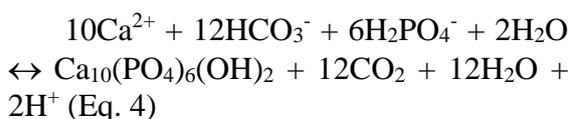
Dois tampões principais são encontrados no mosto cervejeiro. O primeiro deles, vinculado exclusivamente à água potável, é o equilíbrio entre as espécies de carbonato (**Equações 1, 2 e 3**), conhecido como Alcalinidade.



Já o segundo tampão é proveniente do malte devido a presença de íons fosfato. O Fosfato encontra-se ligado, principalmente, como fitina do malte (sal misto de potássio e magnésio do ácido fítico), e é hidrolisado durante a mosturação liberando íons fosfato (H_2PO_4^- , H_3PO_4 , HPO_4^{2-} e PO_4^{3-}). Estes íons por sua vez, reagem com os íons cálcio formando

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (majoritário), $\text{CaH}(\text{PO}_4)$, $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3$, etc.

É a interação entre estes dois sistemas tamponantes, juntamente com a presença de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} que resolvem este quebra-cabeça de mais de 10 equilíbrios (envolvendo o pH), dependentes entre si, durante a etapa de mostura (TAYLOR, 2006). Uma versão resumida proposta por Palmer & Kaminski (2021) encontra-se na **Equação 4**.



De acordo com Declerck (1994) o pH ideal da mostura, a temperatura ambiente, seria de 5,8. Porém, o pH diminui à medida que a temperatura aumenta, praticamente de forma linear segundo Hopkins & Krause (1937).

DeClerck (1994) afirmou ainda que a maioria das enzimas possui atividade elevada em pHs inferiores ao do mosto, por isso, a mostura deveria ser acidificada para 5,0 – 5,2, faixa de valor mais adequado para a enzima protease e para a quebra de fosfatos orgânicos encontrados no malte. Contudo, isso era bom para maltes pouco modificados geneticamente (década de 1950), pois estes apresentavam teores de proteínas entre 29 e 39%. Com a chegada de maltes modificados (teores de proteínas maiores que 40%) essa diminuição no pH para melhorar a atividade enzimática passou a não ser tão significativa.

Já Kunze (1999) afirmou que a melhor faixa de pH para as amilases fica entre 5,5 – 5,6, pois o extrato e o limite de atenuação são maiores quando comparados ao pH usual das mosturas (5,6-5,9). O autor indicou que a redução do pH da mostura causa (i) a redução do tempo e a otimização do processo de mostura; (ii) lavagem e clarificação mais rápidas; (iii) melhor rendimento; (iv) melhor estabilidade de cor; (v) melhor fermentação e (vi) melhor formação de espuma. Para ele então, a faixa

ideal deveria ficar entre 5,4 e 5,6 na etapa de sacarificação e 5,1 e 5,2 após a fervura.

Bamforth (2001) indicou que o valor ideal para atuação das enzimas proteolíticas e de sacarificação variam significativamente de acordo com o substrato escolhido para a receita, ou seja, a estabilidade térmica das enzimas é mais importante que a faixa exata de pH.

Stenholm & Home (1999) indicaram que o pH é importante na extração das enzimas do malte, pois a diminuição do valor do pH da mostura de 5,7 para 5,4 aumentou a extração da enzima dextrinase-limite. Segundo esses autores, a redução do pH com a adição de Ca^{2+} trouxe um efeito sinérgico no desempenho da mostura, comparando-o com a adição de ácidos minerais e orgânicos.

Finalmente, após todas estas discussões, de forma bem generalizada, o pH ideal para o início da mosturação, em temperatura ambiente, seria ótimo entre 5,2 e 5,6 (PALMER & KAMINSKI, 2021).

É preciso que se entenda que o pH da mostura diminui continuamente durante seu processo (geralmente 0,2 unidades) pois mais precipitados de cálcio são formados e a quebra das proteínas do malte por enzimas, liberam aminoácidos e outros compostos com poder tamponante. Neste caso, o pH do mosto antes da fervura varia entre 5,0 e 5,4.

Durante a fervura o pH do mosto também apresenta uma queda (até 0,3 unidades). Isso porque ocorre desnaturação e coagulação de proteínas, adição dos α -ácidos dos lúpulos e reações de *Maillard* (PALMER, 2022).

Por fim, durante a fermentação do mosto, as leveduras absorvem aminoácidos e outros compostos tamponantes, como nutrientes, e excreta prótons (H^+) na forma de ácidos orgânicos (ácidos acético, láctico, fórmico, succínico, etc). Isso faz com que o pH do mosto caia de 0,5 até 1,0 unidade (REINOLD, 1997).

1.3. PH DA CERVEJA DURANTE A ETAPA DE FERMENTAÇÃO

Neste subitem, entraremos em outro ponto importante sobre o pH, sua variação durante a fermentação e como esta variação pode alterar a percepção sensorial das iso-humulonas ou iso- α -ácidos (IBU – *International Bitterness Unit*) provenientes da adição dos lúpulos. (1 IBU é equivalente a 1 mg L⁻¹ de iso- α -ácidos).

Assim, abordaremos um dos estilos mais apreciados pelo público cervejeiro, a *India Pale Ale* (IPA). Esse estilo de cerveja é caracterizado pelo elevado amargor causado a partir da presença de iso- α -ácidos na bebida e provenientes dos α -ácidos (humulonas) dos lúpulos adicionados. Sendo assim, quanto mais α -ácidos a(s) variedade(s) de lúpulo(s) utilizado(s) em uma receita apresentar(em), mais amarga será a cerveja.

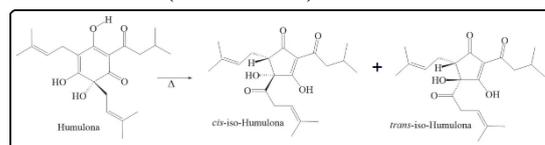
O teor de α -ácidos no lúpulo é muito dependente da cultivar, podendo variar de 0,8%(m/m) como no *Teamaker* (SCHAEFFER *et al.*, 2022) até valores acima de 20%(m/m) como no caso do *Polaris* (<https://www.brewhouseinsumos.com.br/lupulo-polaris>).

A fração desses α -ácidos é composta por uma mistura de cinco humulonas análogas, sendo os seus principais constituintes a humulona (35-70% do total de α -ácidos), a cohumulona (20-55%), a adhumulona (10-15%), a prehumulona (1-10%) e a poshumulona (1-3%) (KARABÍN *et al.*, 2016; VERZELE, 1986; DURELLO *et al.*, 2019). Estudos recentes, entretanto, indicam a descoberta de um novo α -ácido, a acetohumulona (LEKER & MAYE, 2022).

O papel central das humulonas ou α -ácidos na mosturação está relacionado à sua contribuição para o gosto amargo da bebida final, ou seja, a cerveja. Sensorialmente falando, o amargor proporcionado pelo lúpulo equilibra a doçura do malte diminuindo a sensação enjoativa de seus açúcares (PALMER, 2022). A adição dos lúpulos de amargor (teores de α -ácido maiores que 10%) contendo humulonas

ocorre no início da fervura do mosto, durando, aproximadamente, 60 minutos. Durante a fervura, essas humulonas sofrem isomerização transformando-se em iso-humulonas, as quais são mais solúveis em água e mais amargas (Figura 1) (HUVAERE *et al.*, 2004, KEUKELEIRE *et al.*, 1992).

Figura 1: Representação esquemática da isomerização da humulona em suas iso-humulonas (*cis* e *trans*) durante a fervura.



Fonte: Adaptado de Durello *et al.*, 2019.

É importante ressaltar que as 5 humulonas primárias geram 10 iso-humulonas (diastereoisômeros *cis* e *trans*).

Segundo Caballero *et al.*, (2012) os diastereoisômeros da *cis/trans* isohumulona, *cis/trans* isocohumulona e *cis/trans* isoadhumulona são os iso- α -ácidos mais predominantes na cerveja, apresentando 43, 39% e 16,5% do total deles, respectivamente.

Em cervejas com fabricação recente a proporção destes isômeros *trans/cis* é de cerca de 0,4 (INTELMANN *et al.*, 2009), contudo, os compostos *cis* são mais estáveis que os isômeros *trans*. Ou seja, com o passar do tempo esta razão se modifica afetando o sabor e a estabilidade do sabor (KEUKELEIRE, 1999).

Cerca de 80% do sabor amargo da cerveja é causado pelos iso- α -ácidos (KEUKELEIRE *et al.*, 1992), mas existem grandes diferenças no amargor dos compostos quando avaliados individualmente. Sabe-se que uma mistura de *cis*- e *trans*-isohumulonas tem um sabor mais amargo na cerveja do que as *trans*-isohumulonas isoladamente (KAPPLER *et al.*, 2010). Além disso, o componente *cis* é significativamente mais amargo que o componente *trans* e as isohumulonas são mais amargas que as isocohumulonas

(HUGHES, 2000; HUGHES & SIMPSON, 1996).

Portanto, de acordo com Malowicki & Shellhammer (2005), as *cis*-iso-humulonas são consideradas as principais moléculas responsáveis pelo amargor da cerveja.

Malowicki & Shellhammer (2006) em outro trabalho descreveram ainda essa isomerização com cinética de primeira ordem e degradação considerável das iso-humulonas formadas após duas meias vidas da sua concentração inicial (elevado tempo de fervura). Além disso, segundo os autores, durante a fervura, a concentração de iso-humulonas no meio se manteve estável, mesmo com a variação do pH (entre 4,8 – 6,0).

Dentre os fatores que influenciam a solubilidade das iso-humulonas no mosto cervejeiro encontra-se: (i) o pH do mosto (entre 5,2 e 5,6, definido no item 1.2.) onde a taxa máxima de solubilidade dessas moléculas é de 30%; (ii) a densidade do mosto (quanto maior for a densidade, menor será a solubilidade das iso-humulonas); e o principal deles (iii) o tempo de fervura. Neste caso, quanto maior for o tempo de fervura do lúpulo no mosto cervejeiro (até um tempo limite), maior a taxa de isomerização (PALMER, 2022).

Diferentes métodos analíticos como potenciometria (SPETSIG, 1955; SEATON *et al.*, 1986; SIMPSON & SMITH, 1992), espectrofotometria e extração líquido-líquido (RUDIN, 1960; ONO *et al.*, 1985) foram utilizados para determinar o pK_a das iso-humulonas. Os resultados discrepantes encontrados nestes trabalhos indicam a natureza complexa dos equilíbrios associados a tais compostos.

Segundo Simpson (1993), por exemplo, o pK_a da *trans*-iso-humulona medido por potenciometria foi de 3,1 (variando entre 2,82 – 4,04 em meio aquoso). Já por condutivimetria o valor ficou próximo de 3,23.

De acordo com Rudin (1960) o pK_a da *trans*-iso-humulona, determinado experimentalmente por espectrofotometria,

foi de 3,3, tornando-as aniônico no pH típico da cerveja (entre pH 4 e 4,7). A solubilidade aquosa relativamente limitada levantou então a questão de saber se as iso-humulonas estavam de fato dissolvidas em sua forma molecular na cerveja ou presentes de forma desprotonada. Neste caso, ainda segundo o autor, a solubilidade aquosa das iso-humulonas aumentou de 2.000 mg mL⁻¹ para 11.000 mg mL⁻¹ entre pH 3,5 e 5,2, respectivamente. Davies (1957) indicou que as iso-humulonas seriam moderadamente solúveis em ambiente aquoso e que através de uma aproximação matemática, seu pK_a pôde ser estimado a partir do seu equilíbrio hidrofílico-lipofílico (pK_a aproximado de 2,25) (LU & BERGENSTÄHL, 2021).

Mais de 60 anos depois dos estudos de Rudin (1960) e Davies (1957) outros autores (CABALLERO *et al.*, 2012) ainda indicam valores aproximados de pK_a para as iso-humulonas (em torno de 3), porém, sem a obtenção de novos dados experimentais.

1.4. QUESTIONAMENTOS E HIPÓTESES

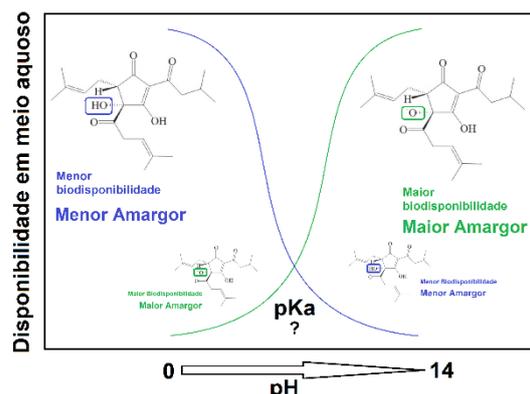
Devido a conclusão lógica sobre a falta de um valor preciso do pK_a das iso-humulonas, pode-se supor que elas sigam as regras aplicadas à ácidos fracos, ou seja, em pHs abaixo de seu pK_a , o equilíbrio do sistema manteria a maior parte das iso-humulonas em sua forma molecular (não ionizada), enquanto valores de pH superiores ao pK_a destas moléculas deslocariam o equilíbrio do sistema para o sentido oposto, ou seja, sua forma ionizada (desprotonada).

Segundo Lewis & Young (2002) e Retondo & Farias (2008) moléculas carregadas negativamente ou parcialmente ionizadas são capazes de interagir mais intensamente com receptores específicos na língua (receptores gustativos do tipo amargo, chamados receptores TAS2R, intensificando a sensação do amargo. Ou seja, em pHs acima do pK_a destas iso- α -ácidos, o equilíbrio estaria deslocado para a forma desprotonada, conseqüentemente a

cerveja apresentaria uma percepção do amargor mais pronunciada.

O mais interessante disso tudo é que essa biodisponibilidade/amargor, não se apresentaria de forma linear e sim logarítmica (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática da hipótese pH versus biodisponibilidade na cerveja.



Fonte: Autoria própria.

Seguindo esta lógica e alguns resultados do estudo de Rubin (1960), questionamos:

“Será que alterar o pH de uma cerveja na etapa de maturação altera a percepção de amargor dela?”

Podemos perguntar de outra forma ainda: *“Será que uma cerveja com 100 IBUs no rótulo, realmente apresenta essa percepção sensorial?”*

Por isso, tomamos a liberdade de apresentar aqui dois termos novos: o **IBU teórico ou experimental** e o **IBU real**.

O **IBU teórico ou experimental** seria o valor obtido, experimentalmente, em meio ácido, como indicado pelo método oficial EBC 9.8 (*Bitterness of Beer*), enquanto o **IBU real** seria medido no pH encontrado na cerveja analisada, ou seja, sem a adição de ácido clorídrico 6 mol L⁻¹ como indicado pelo mesmo método EBC 9.8.

Assim, a hipótese principal discutida neste artigo é de que a biodisponibilidade das iso-humulonas em sua forma desprotonada, ou seja, em pHs acima de 4,2, estariam mais presentes nas

cervejas e, portanto, tornariam as mesmas mais amargas.

Como o pH final das cervejas, normalmente, varia entre 4,0 e 4,7, e não sabemos com segurança qual o pK_a destes compostos, se estivéssemos próximo de seu valor de pK_a, uma pequena alteração no pH do meio faria a biodisponibilidade dessas moléculas aumentar consideravelmente (passagem da forma molecular para a forma ionizada).

Portanto, o objetivo central deste trabalho foi aumentar a percepção sensorial das iso-humulonas, ou seja, do **IBU real**, em amostras de cervejas artesanais através de um leve incremento no pH das amostras no início da maturação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. REAGENTES

Isooctano p.a. (NEON), ácido clorídrico (32% em H₂O, FCC) (Sigma-Aldrich) e, Bicarbonato de Sódio grau alimentício (Velez) foram obtidos em estabelecimentos regulamentados na cidade de Vitória – ES.

2.2. EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

O Espectrofotômetro UV-Vis utilizado foi um *Thermo Scientific Genesys 6* com carrossel de 6 lugares e cubetas de quartzo contendo 1 cm de caminho óptico.

O pHmetro utilizado foi o modelo *827 pH Lab* da Metrohm calibrado com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0.

2.3. AMOSTRAS DE LÚPULO E CERVEJA

A amostra de lúpulo da variedade *Columbus* da marca LNF foi adquirida em estabelecimento específico de venda de produtos cervejeiros localizada na cidade de Vitória – ES. Em seu rótulo esta variedade apresentava o valor de 15% (m/m) de α-ácidos ou humulonas.

Já as amostras de cerveja nos estilos *Session IPA* e *IPA* foram adquiridas em cervejarias da cidade de Vila Velha - ES

registradas no MAPA (Ministério da Agricultura e Pecuária).

2.4. ÁGUA LUPULADA

A produção de uma amostra de 1 litro de água lupulada (IBU 40) foi realizada utilizando-se 0,80 g do lúpulo *Columbus* agitados mecanicamente por 60 minutos sob fervura. O pH da água destilada utilizada foi ajustado para 5,2 no início do experimento. pH este indicado para mostos em início de fervura (MALOWICK & SHELLHAMMER, 2005).

2.5. ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS PARA DETERMINAÇÃO DO IBU

Em erlenmeyers de 125 mL, com tampa e agitação mecânica por 20 minutos, foram adicionadas alíquotas de 10 mL das amostras de (i) chá de lúpulo ou (ii) cerveja, 0,5 mL de ácido clorídrico 6 M (não em todos os experimentos) e 20 mL de isooctano. Após a separação dos líquidos, as absorvâncias das fases orgânicas, em 275 nm, foram lidas. Nas leituras o isooctano p.a. foi utilizado como branco. Por fim, os valores de absorvância obtidos multiplicados por 50 resultaram nos IBUs experimentais das amostras.

Vale lembrar que antes das análises, as amostras de cerveja foram desgaseificadas por 30 minutos em banho ultrassônico.

2.6. ANÁLISES SENSORIAIS QUALITATIVAS

As 3 amostras estudadas (água lupulada, *Session* IPA e IPA) foram analisadas sensorialmente por 4 mestres cervejeiros e 6 alunos de iniciação científica do curso de Bacharelado em Química Industrial do Ifes de Vila velha – ES. Estas análises qualitativas consistiram em provar (teste cego) as 3 amostras em pHs 4,2 e 4,6 e indicar qual delas era mais amarga e se esse incremento no amargor era perceptível.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da análise de pH de quase 300 amostras de cerveja vinculadas 3ª Copa Capixaba de Cerveja Artesanal, realizada em novembro de 2024 em Vitória – ES foi possível determinar as faixas de pH mais extremas encontradas (3,07 – 4,95). De forma mais específica as 59 IPAs e 50 *Session* IPAs desta copa variaram seus pHs entre 3,98 e 4,70. Assim, levando-se em consideração que a maioria das cervejas terminam seu processo fermentativo apresentando pH aproximado entre 4,0 e 4,7. Todos os estudos foram realizados entre estes valores.

pHs acima de 4,8 não foram testadas, pois podem resultar em ionizações de outros compostos, como os β -ácidos (lupulonas) e alterar todo o equilíbrio dos tampões descritos no item 1.2., resultando em alterações sensoriais indesejadas.

4.1. ÁGUA LUPULADA

Através da equação 5, e utilizando-se do lúpulo da variedade *Columbus* contendo 15%(m/m) de α -ácidos, 1 litro de água lupulada com **IBU Teórico** de 40 unidades foi produzida.

$$IBU = \frac{\alpha - \text{Ácidos}(\%) * \text{Taxa de conv. } \alpha - \text{ácidos} * \text{Lúpulo}(g) * 10000}{\text{Volume final da cerveja (mL)} * \text{densidade}(g/mL)} \quad (eq. 5)$$

onde a taxa de conversão de α -ácidos utilizada com 60 minutos de fervura foi de 0,33.

Três frações desta água lupulada foram analisadas em triplicata. A primeira delas em meio fortemente ácido (**1**), a segunda em pH ajustado de 4,2 (**2**) e a terceira em pH ajustado de 4,6 (**3**).

Quando medimos o IBU da fração **1**, de acordo com o método EBC 9.8, ou seja, com adição de 0,5 mL de HCl 6 M nota-se que o resultado obtido (37 unidades) ficou próximo do valor teórico, ou seja, 40. Por outro lado, as frações **2** e **3** apresentaram resultados inferiores, sendo a fração **3** a menor de todas (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de absorbância obtidos experimentalmente para as amostras de água lupulada, *Session* IPA e IPA em diferentes pHs.

Amostra	pH	Absorbância	IBU Exp.
Água lupulada	EBC 9.8	0,74±0,01	37,0± 0,4
Água lupulada	pH 4,2	0,55±0,01	27,8±0,8
Água lupulada	pH 4,6	0,47±0,02	23,5±0,9
Session	EBC 9.8	0,66±0,01	33,3± 0,4
Session	pH 4,2	0,58±0,01	29±0,2
Session	pH 4,6	0,45±0,02	22,5±0,5
IPA	EBC 9.8	1,22±0,07	61± 3
IPA	pH 4,2	0,97±0,01	48,5±0,4
IPA	pH 4,6	0,87±0,01	43±0,1

Fonte: Autoria própria.

É notório que o valor de IBU obtido experimentalmente em pH 4,6 (fração 3) ficou bem abaixo do valor esperado (IBU 40), uma queda de, aproximadamente, 36,5 %. Isso é compreensível pois meios fortemente ácidos (fração 1) fazem com que o equilíbrio entre as espécies de iso-humulonas (desprotonada/molecular) tendam a se manter na forma molecular (menos solúvel em sistemas aquosos) e isso faz com que essas moléculas sigam para o isooctano (solvente orgânico) durante a extração, conseqüentemente, o IBU experimental fica próximo do IBU teórico. Em pH 4,2 (fração 2), essa queda no valor também é notada, porém, de forma menos acentuada (24,9 %).

4.2. AMOSTRAS DE CERVEJA

Duas amostras de cerveja de cervejarias diferentes foram coletadas para análise de seu IBU e pH. Uma *Session* IPA com IBU teórico de 35 e pH original de 4,7; e uma IPA com IBU teórico de 60 e pH original de 4,2.

Três frações de cada uma delas em pHs diferentes também foram analisadas em triplicata.

4.2.1. *Session* IPA

Todas as frações foram analisadas por espectrofotometria no UV-vis e seus valores experimentais de IBU estão indicados na tabela 1. De acordo com os resultados, uma queda de 32,4 % do valor

IBU experimental/teórico (fração 1) foi notada na fração 3.

O interessante desta amostra é que apresentava, originalmente, um pH de 4,7, e na análise sensorial seu amargor estava acentuado de forma correta segundo os provadores e mestres cervejeiros. Por outro lado, quando seu pH foi baixado para 4,2 o amargor foi reduzido.

4.2.2. IPA

Nesta amostra, o mesmo critério das anteriores foi seguido, ou seja, 3 frações foram separadas, sendo uma delas com pH original de 4,2 (fração 2), uma com pH ajustada para o pH 4,6 (fração 3) e uma ajustada para um pH fortemente ácido (fração 1). Todas as frações foram analisadas por espectrofotometria no UV-vis e seus valores experimentais de IBU estão indicados na tabela 1.

Uma queda do IBU experimental de 28,3 % da fração 3 para a fração 1 foi calculada.

Nesta amostra, diferente da *Session* IPA, o pH original precisou ser ajustado para 4,6, e foi através deste ajuste, que os resultados das análises sensoriais apresentaram um amargor mais acentuado.

Precisamos notar nos experimentos realizados *versus* análises sensoriais que a queda no **IBU experimental** de cervejas com pH mais elevado (4,6) (frações 3) é inversamente proporcional ao **IBU real**. Ou seja, a avaliação sensorial dessas cervejas indica que o amargor percebido é maior. Por outro lado, o **IBU experimental** das frações 2 (pH 4,2) apresenta maiores valores, porém com menor percepção de amargor. Estes resultados, num primeiro momento, confusos, podem ser explicados pelo fato de que quando medimos o **IBU experimental**, estamos quantificando, majoritariamente, as iso-humulonas em sua forma molecular (protonada), ou seja, menos solúvel em água e menos amarga. Então, em pH 4,2 uma quantidade maior desta forma molecular está presente na cerveja (IBU maior, percepção sensorial menor). Já em pH 4,6 ou 4,7, a quantidade da forma

ionizada ou desprotonada encontra-se elevada, portanto, IBU experimental mais baixo e percepção sensorial do amargor mais acentuado.

4.3. PROPOSTA DE AJUSTE DO PH

Nesta sessão, uma proposta de ajuste do pH final das cervejas é apresentada. Importante indicar que, esse ajuste sempre será para o pH 4,6, onde os mestres cervejeiros e provadores notaram um amargor mais acentuado e positivo.

Todos os cálculos foram pensados para um litro (1 L) de cerveja no início da etapa de maturação e pH final medido entre 4,0 e 4,5.

É importante ressaltar que a cerveja é um sistema tamponado e que cada receita apresentará suas peculiaridades em tais tampões. Portanto, os ajustes deverão ser realizados caso a caso.

Neste sentido, a melhor forma encontrada de avaliar e ajustar sua cerveja é através da titulação de uma pequena amostra, na etapa de maturação, com NaHCO_3 (grau alimentício) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Em experimentos realizados com 5 estilos de cerveja produzidos pelo grupo de pesquisa (Lacemp), 50,00 mL destas amostras de cerveja, previamente desgaseificadas, foram tituladas e seus valores de NaHCO_3 (em gramas) que deveriam ser adicionados foram extrapolados para 1 litro de cerveja.

Assim, partindo de um pH inicial de 4,2, foram necessários de 200 até 270 mg de NaHCO_3 por litro para alcançar o pH desejado de 4,6. Uma adição aproximada de 50 até 67 mg para cada décimo de pH aumentado (4,2; 4,3; 4,4; 4,5; 4,6). Para calcular a quantidade (g) de NaHCO_3 que deve ser adicionada nos fermentadores existentes (100, 250, 500, 1000 L, etc) basta realizar a titulação de 50,00 mL de sua cerveja e utilizar a equação 6.

$$M_{\text{NaHCO}_3 \text{ para 1 litro}}(\text{g}) = \text{Conc. NaHCO}_3 (\text{mol L}^{-1}) \times \text{volume obtido na titulação (L)} \times 84,007 \text{ g mol}^{-1} \times 20 \times \text{litragem do seu fermentador.} \quad (\text{eq. 6})$$

5 CONCLUSÃO & PERSPECTIVAS

A partir da (i) breve revisão bibliográfica apresentada, (ii) da falta de um valor preciso de pK_a das iso-humulonas e (iii) os resultados experimentais obtidos podemos concluir que dependendo do pH final que uma cerveja apresenta, a percepção sensorial de seu amargor pode ser consideravelmente afetada de forma negativa (menor amargor) do que o indicado pelo fabricante.

Assim, indicamos, a quem interessar minimizar esta discrepância sensorial em suas cervejas, ajustar o pH delas, para 4,6, quando as mesmas apresentarem pH original abaixo deste valor, ou seja, entre 4,0 e 4,5.

Por fim, sabemos da dificuldade em acessar a parte interna dos fermentados ao final da fermentação e início da maturação, uma vez que muitos encontram-se pressurizados e sua abertura pode causar contaminação microbiológica. Em fermentadores que possuem bazuca para *dry-hopping* a adição do NaHCO_3 pode ser facilmente realizada sem entrar oxigênio. Em outros casos, sabemos também da elevada capacidade inventiva dos cervejeiros e, portanto, não temos dúvidas que este pequeno empecilho será resolvido facilmente por estes mestres.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos as Cervejarias “A Fabrica” e “Mangue Beer” da cidade de Vila Velha - ES pelo fornecimento das amostras de cerveja.

Agradecemos também aos mestres cervejeiros Mayra Neres da Silva, Vitória Magalhães Bona, Fabio e Henrique Renoldi pela participação imprescindível nas análises sensoriais.

REFERÊNCIAS

BAMFORTH, C. (2001) pH in Brewing: An Overview. MBAA Technical Quarterly, v. 38, n. 1, p. 2-9.

BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM. Guia de Estilos 2021. Guia de Estilos de Cerveja. Direitos Autorais © 2022, BJCP, Inc. BJCP, 2021.

CABALLERO, I.; BLANCO, C. A.; PORRAS, M. (2012) Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage, Trends in Food Science & Technology, v. 26, p. 21. DOI:10.1016/j.tifs.2012.01.001

DAVIES, J. T. (1957) A quantitative kinetic theory of emulsion type. I. Physical chemistry of the emulsifying agent, in: Gas/Liquid and Liquid/Liquid Interface, Proceedings of the International Congress of Surface Activity, v.1, p. 426–438.

DECLERCK, J. (1994) A Textbook of Brewing. Chicago: Siebel Institute, v. 1.

DURELLO, R. S., SILVA, L. M., BOGUSZ JUNIOR, S. (2019). Química do lúpulo. Química Nova, v. 42, p. 900-919. DOI:10.21577/0100-4042.20170412

EUROPEAN BREWING CONVENTION. **EBC 9.8**. Bitterness of Beer (IM). <https://brewup.eu/ebc-analytica/beer/bitterness-of-beer-im/9.8>

HIERONYMUS, S. (2020) Lúpulo: Guia Prático para aroma, amargor e cultivo de lúpulo, 2.ed. Belo Horizonte: Letramento; Fome de? 2021; Editora Krater.

HOPKINS R. H.; KRAUSE, C. B. (1937) Biochemistry applied to malting and brewing, London: Allen & Unwin.

HUGHES, P. S. (2000). The significance of iso-alpha-acids for beer quality Cambridge prize paper. Journal of the Institute of

Brewing, v. 106, n. 5, p. 271e276. DOI:10.1002/j.2050-0416.2000.tb00066.x

HUGHES, P. S.; SIMPSOM, W. J. (1996). Bitterness of congeners and stereoisomers of hop-derived bitter acids found in beer. Journal of the American Society of Brewing Chemists, v. 54, p. 234e237. DOI: 10.1094/ASBCJ-54-0234

HUVAERE, K.; OLSEN, K.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H.; HEYERICK, A.; KEUKELEIRE, D. (2004). Riboflavin-sensitized photooxidation of isohumulones and derivatives. Photochemical & Photobiological Sciences, v. 3, p. 337e340. DOI:10.1039/B316210A

INTELMANN, D.; HASELEU, G.; HOFMANN, T. (2009). LC-MS/MS quantitation of hop-derived bitter compounds in beer using the ECHO technique. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 57, n. 4, p. 1172e1182. DOI: 10.1021/jf803040g

KAPPLER, S.; SCHONBERGER, C.; KROTTENTHALER, M.; BECKER, T. (2010). Isohumulones: a review. Brewing Science, v. 63, p. 105e111. ISSN: 18665195

KARABÍN, M.; HUDCOVA., T.; JELINEK, L.; DOSTALEK, P. (2016) Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 15, p. 542. DOI:10.1111/1541-4337.12201

KEUKELEIRE, D.; VINDEVOGEL, J.; SZIICS, R.; PAT, S. (1992). The history and analytical chemistry of beer bitter acids. Trends in Analytical Chemistry, v. 77, n. 8, p. 275e280.

KEUKELEIRE, D. (1999). Fundamentals of beer and hop chemistry. Química Nova, v. 23, n. 1, p. 108e112. DOI:10.1590/S0100-40422000000100019

- KUNZE, W. (1999) Technology Brewing and Malting. Intl Ed.: BLB Berlin.
- LEKER, J.; MAYE, J. P. (2022) Discovery of Acetohumulone and Acetolupulone a New Hop Alpha Acid and Beta Acid, Journal of the American Society of Brewing Chemists.
DOI:10.1080/03610470.2022.2079944
- LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. (2002) Brewing, 2nd ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- LU, Y.; BERGENSTÅHL, B. (2021) Condensation of iso-humulone in solution and at hydrophobic surfaces, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 613 p.126102. DOI:10.1016/j.colsurfa.2020.126102
- MALLET, J. (2021) Um Guia Prático do Campo à Cervejaria, 1.ed. Porto Alegre, RS: Editora Krater.
- MALOWICKI, M. G.; SHELLHAMMER T. H. (2005) Isomerization and degradation kinetics of hop (*Humulus lupulus*) acids in a model wort-boiling system Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53, p. 4434. DOI:10.1021/jf0481296
- MALOWICKI, M. G.; SHELLHAMMER, T. H. (2006) Factors Affecting Hop Bitter Acid Isomerization Kinetics in a Model Wort Boiling System, Journal of the American Society of Brewing Chemists, v. 64, p. 29-32. DOI:10.1094/ASBCJ-64-0029
- ONO, M.; KAKUDO, Y.; UEDA, S. (1986) Automated Analysis of Hop Bittering Components with High Performance Liquid Chromatography Using Precolumn Switching. Analytical Science, v. 2, p. 235–238. DOI:10.2116/analsci.2.235
- PALMER, J.; KAMINSKI, C. (2021) Água: Um Guia Completo Para Fabricantes de Cerveja. 1.ed. Porto Alegre, RS: Editora Krater.
- PALMER, J. (2022) How to brew: Tudo o que você precisa saber para fazer excelentes cervejas, 1.ed. Porto Alegre – RS: Editora Krater.
- REINOLD, M. R. (1997) Manual Prático de Cervejaria. São Paulo: Aden Editora.
- RETONDO, C. G.; FARIA, P. (2008) Química das Sensações, Ed. Átomo, 2ª ed. Campinas.
- RUDIN, A. D. (1960) Solubility of iso-compounds in water and their State in solution, Journal of the Institute of Brewing, v. 66, p. 18.
- SCHAEFFER, G.; RIBEIRO J. S.; FARIAS, C. C. (2023) Avaliação da atividade Antioxidante in vitro das variedades de lúpulo *Cascade* e *Teamaker* cultivados no Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biomedicina) - Instituto Federal do Espírito Santo, Vila Velha.
- SEATON, J. C.; MOIR, M.; FORREST, I. S.; BLOOMFIELD, C.; ARNOLD, N. J. (1986) Proceedings of the 19th Convention of the Institute of Brewing (Australia & New Zealand Section). Institute of Brewing, 145.
- SIMPSON, W. J.; SMITH, A. R. W. (1992) Factors affecting antibacterial activity of hop compounds and their derivatives, Journal of Applied Bacteriology, v. 72, p. 327. DOI:10.1111/j.1365-2672.1992.tb01843.x
- SIMPSON, W. J. (1993) Ionization behaviour of hop compounds and hop-derived compounds, Journal of the Institute of Brewing, v. 99, p. 317-326.
- SÖRENSEN, S. P. L. (1909). "Enzymstudien. II. Mitteilung. Über die

Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen" {ENG.: Enzyme studies. 2nd Report. On the measurement and the importance of hydrogen ion concentration during enzymatic processes}. - Biochemische Zeitschrift, 21: 131–304. <https://d-nb.info/1125891521/34>

SPETSIG, L. O. (1955) Electrolytic Constants and Solubilities of humulic acids, humulone and lupulone, Acta Chemica Scandinavica, v. 9, p. 1421.

STENHOLM, K.; HOME, S. A. (1999) New approach to limit Dextrinase and its role in Mashing, Journal of the Institute of Brewing, v. 105, p.205-210.

TAYLOR, D. Water. In: Priest, F., Stewart, G. (Ed). Handbook of Brewing, 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2006.

VERZELE, M. (1986) 100-Years of hop chemistry and its relevance to brewing Journal of the Institute of Brewing, v. 92, p. 32.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. (2020) Levedura: Guia Prático para fermentação de cerveja, 1.ed. Porto Alegre, Rs: Editora Krater.