



Catarina Pinto Lima

**Identificação das causas de oxidação da cerveja e
métodos de mitigação**



Catarina Pinto Lima

Identificação das causas de oxidação da cerveja e métodos de mitigação

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, ramo Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes, Investigadora do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e orientação empresarial do Eng. Nicolas Billard, Sócio-gerente da empresa Essência D'Alma, Lda.

A ti, Manu.

o júri

presidente

Doutora Rita Maria Pinho Ferreira
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

Doutor Fernando Jorge Gonçalves
Professor Auxiliar da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Viseu

orientador

Doutora Cláudia Sofia Cordeiro Nunes
Investigadora Doutorada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores, Doutora Cláudia Nunes e Engenheiro Nicolas Billard, por todo o apoio, acompanhamento, dedicação e partilha de conhecimento.

Agradeço a todos os colegas da empresa Essência D'Alma Lda., em especial ao Daniel, Tiago, Lídia e Bárbara pela ajuda, paciência, partilha de conhecimento e por proporcionarem bons momentos. Agradeço aos meus colegas de estágio, Diana e Tiago, por toda a ajuda, pelas gargalhadas e por tornarem tudo mais fácil e apoiarem-me nesta etapa. Sem o saberem fizeram com que as coisas fossem menos complicadas e tornaram-se bons amigos. Força, foco e fé!

Aos meus irmãos, os homens da minha vida, agradeço por terem feito nascer em mim esta paixão pela cerveja. Agradeço por serem os melhores irmãos e amigos e por estarem ao meu lado e me apoiarem sempre. Uma vez um deles disse-me: "o importante é fazer aquilo que gostes e seres feliz." Assim o farei e só quero que tenham orgulho em mim. O amor que sinto por vocês é eterno.

Aos meus pais, um grande obrigado por tudo. Obrigada por tornarem isto possível e por me apoiarem incondicionalmente.

Por fim, quero agradecer a todos os meus amigos, em especial à Bé e à Cátia. Obrigada Bé pelo apoio incondicional 24h sobre 24h. Obrigada por nunca me deixares desistir e acreditares em mim. Sem ti até poderia conseguir mas seria tudo muito mais difícil. Cátia, um grande obrigado por todo o teu apoio. Obrigada por estares sempre presente e me ajudares quando mais precisei.

palavras-chave

cerveja, processo cervejeiro, oxigénio dissolvido, oxidação

resumo

A cerveja é uma bebida alcoólica não destilada, que tem como ingredientes básicos água, malte, lúpulo e levedura. O processo cervejeiro começa com a moagem do malte, seguido da sua brassagem. O mosto, obtido por filtração, é fervido com lúpulo e depois é clarificado e arrefecido. A fermentação ocorre por adição de leveduras e após esta etapa a cerveja é maturada, filtrada e carbonatada.

A presença do oxigénio durante o processo produtivo afeta negativamente a cerveja, conferindo-lhe sabores e aromas indesejáveis. O oxigénio reage com outras moléculas formando radicais livres e espécies reativas de oxigénio (ROS) que reagem com alguns constituintes presentes na cerveja produzindo compostos que conferem características indesejáveis na cerveja. No entanto, o oxigénio é essencial na etapa da fermentação para o crescimento da levedura. Após esta etapa é importante evitar a entrada de oxigénio no produto, de forma a evitar as reações de oxidação. O produto final não deve exceder os 50 ppb de oxigénio dissolvido (OD).

Esta dissertação foi executada em ambiente empresarial, na empresa Essência D'Alma, Lda., proprietária da marca de cerveja artesanal Vadia. O objetivo deste trabalho foi o acompanhamento do OD ao longo das diferentes etapas de produção, nomeadamente fermentação, maturação, *dry-hopping* (inserção de lúpulo seco na cerveja fermentada), filtração e carbonatação. Os valores obtidos permitiram identificar as etapas onde ocorre a maior incorporação de oxigénio no produto. Na fermentação o conteúdo em oxigénio é elevado (entre os 21 e 45 ppb) e, apesar de ser necessário, deve ser inferior a 10 ppb, assim deve haver um controlo rigoroso da quantidade de oxigénio injetado no mosto. Nas etapas *dry-hopping* e filtração, o OD foi elevado, sendo a principal causa do aumento de oxigénio dissolvido a entrada de ar por fugas no sistema. Na etapa da filtração verificou-se que, a filtração por terras diatomáceas é mais prejudicial que a filtração por cartuchos, pois ocorre uma maior incorporação de oxigénio, provavelmente devido à utilização de água com oxigénio dissolvido durante a filtração.

O acompanhamento do oxigénio dissolvido, nas etapas do processo cervejeiro, confirmou que os valores de OD são superiores aos valores recomendados, e que em todas as etapas houve incorporação de oxigénio. Assim, é importante implementar métodos para reduzir a captação de oxigénio durante o processo cervejeiro. A eliminação de ar residual na tubagem, o isolamento dos sistemas de *dry-hopping*/filtração e carbonatação, o uso de água sem oxigénio na filtração por terras diatomáceas, bem como o uso de CO₂ como gás de contrapressão, são alguns métodos propostos para evitar a oxidação da cerveja, mantendo as suas características sensoriais durante o armazenamento.

keywords

beer, brewing, dissolved oxygen, oxidation

abstract

Beer is a non-distilled alcoholic drink that have water, malt, hops and yeast as basic ingredients. The brewing process begins with a malt grind followed by a mash. After this process the wort, obtained by filtration, is boiled with hops and then clarified and cooled. Fermentation takes place by adding yeasts and after this stage the beer is maturated, filtered and carbonated.

The presence of oxygen during the production process negatively affects the beer, giving undesirable flavors and aromas. Oxygen reacts with other molecules forming free radicals and reactive oxygen species (ROS) that react with some components present in the beer producing compounds that confer undesirable characteristics to the beer. However, oxygen is essential in the fermentation stage for yeast growth. After this step, it is important to prevent oxygen in the product in order to avoid oxidation reactions. The final product should not exceed 50 ppb of dissolved oxygen (DO).

This dissertation was carried out in business environment, at the company Essência D'Alma, Lda., owner of the craft beer brand Vadia. The objective of the work was to follow DO throughout the different stages of beer production, namely fermentation, maturation, dry-hopping, filtration, and carbonation. The obtained values allowed to identify the stages where the oxygen incorporation occurs in a higher extend. In fermentation the oxygen content is high (between 21 and 45 ppb). Although necessary it must to be less than 10 ppb, then should have a strict control of the quantity of oxygen injected into the must. In the dry-hopping and filtration stages DO was high, being the main cause of the increase of dissolved oxygen the leaks in the system. In the filtration stage, it was found that filtration by diatomaceous earth is more harmful than filtration by cartridges, as there is a greater incorporation of oxygen, probably due to the use of water with high content of oxygen during filtration.

The monitorization of dissolved oxygen through the stages of the brewing process, confirmed that the DO values are higher than the recommended values in all stages. Thus, it is important to implement methods to reduce oxygen uptake in the brewing process. The elimination of residual air in the piping, the isolation of dry-hopping, filtration and carbonation systems, the use of oxygen-free water in filtration through diatomaceous earth, as well as the use of CO₂ as a back pressure gas, are some methods proposed to prevent beer oxidation, maintaining its sensory characteristics during storage.

Índice

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	iv
Lista de Abreviaturas	v
<i>1. Introdução</i>	1
1.1. Estrutura da dissertação.....	1
1.2. A empresa.....	1
1.3. Enquadramento e objetivo do trabalho.....	2
<i>2. Revisão Bibliográfica</i>	4
2.1. Cerveja	4
2.2. Matérias-primas.....	5
2.2.1. Água	5
2.2.2. Cereais	7
2.2.3. Lúpulo.....	9
2.2.4. Leveduras.....	11
2.3. O processo cervejeiro	13
2.4. As reações do oxigénio na cerveja	17
2.4.1. O oxigénio nas diferentes etapas da fabricação da cerveja	19
2.4.1.1. Oxigénio na maltagem e no início da produção de cerveja.....	19
2.4.1.2. Oxigénio na fermentação e aeração do mosto.....	22
2.4.1.3. Oxigénio no envelhecimento da cerveja	23
2.5. Métodos para a redução da oxidação da cerveja	26
<i>3. Materiais e métodos</i>	28
3.1. Medição do oxigénio dissolvido na cerveja	28
3.2. Medição do oxigénio durante o processo de fabricação da cerveja	31
3.2.1. Fermentação.....	31
3.2.2. Maturação	33
3.2.3. <i>Dry-hopping</i>	34
3.2.4. Filtração	35
3.2.5. Carbonatação	36

4.	<i>Resultados e discussão</i>	38
4.1.	Caracterização das cervejas analisadas	38
4.2.	Determinação do oxigênio dissolvido ao longo do processo cervejeiro	39
4.2.1.	Fermentação e/ou maturação	40
4.2.2.	<i>Dry-hopping</i>	42
4.2.3.	Filtração	45
4.2.4.	Carbonatação	51
5.	<i>Conclusões</i>	55
	<i>Referências Bibliográficas</i>	56

Índice de Figuras

Figura 1 – Cervejas e sidras produzidas na empresa Essência D'Alma, Lda.	2
Figura 2 - Isomerização do α -ácido humulona ⁷	10
Figura 3 – Esquemática da segunda etapa da fermentação, a conversão do piruvato em etanol. PDH: piruvato desidrogenase. TCA- ácido tricarbóxico ²	12
Figura 4- Representação esquemática do processo cervejeiro ¹	13
Figura 5 - Visão geral das vias de oxidação enzimática atualmente conhecidas do ácido linoleico ²⁸	20
Figura 6 - Reação de etanol com o radical hidroxilo na cerveja ²⁸	25
Figura 7 - <i>Orbisphere</i> 3100 da marca HACH.	28
Figura 8 – Esquema da tecnologia LDO ^{®38}	29
Figura 9- 1- entrada da amostra, 2- saída da amostra.	29
Figura 10 - Adaptador que faz a ligação entre o tubo de <i>nylon</i> e a cuba.	30
Figura 11 - Linha de montagem do <i>Orbisphere</i> 3100 à cuba.	30
Figura 12 - Sistema de <i>dry-hopping</i> na empresa.	34
Figura 13 - Sistema de carbonatação na empresa.	37
Figura 14- Oxigénio dissolvido nas cervejas Rubi 1,2 e 3, Trigo 1, Nautika 1, Extra 1, Loira 1 e Thartaruga 1 na fermentação e maturação.	40
Figura 15- Oxigénio dissolvido na cerveja Thartaruga 1 antes e depois do <i>dry-hopping</i> . ..	43
Figura 16- Oxigénio dissolvido na cerveja Brut IPA 1 antes e depois do segundo <i>dry-hopping</i>	43
Figura 17 – Oxigénio dissolvido nas cervejas Nautika 1, Rubi 2 e Extra 1 antes e depois da filtração por cartuchos (5 μ m).	46
Figura 18 – Oxigénio dissolvido nas cervejas Brut IPA 1 e Thartaruga 1 antes e depois da filtração por terras diatomáceas.	47
Figura 19- Oxigénio dissolvido nas cervejas Nautika 1, Trigo 1, Brut IPA 1, Extra 1, Thartaruga 1 e na mistura das Rubi 1,2 e 3 antes e depois da carbonatação.	52

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Classificação da água de acordo com a sua dureza. 1°dH = 10 mg CaO/L = 1g CaO/hL ou 7,19 mg MgO/L (forma em que é definida a dureza da água na Alemanha).	6
Tabela 2 - Composição química da cevada ⁶	9
Tabela 3 - Vantagens e desvantagens da aeração do mosto quente e frio ³¹	23
Tabela 4 - Análises físico-químicas das cervejas Rubi 1, 2 e 3, Nautika 1, Trigo 1 e Extra 1 e viabilidade das leveduras utilizadas nas respectivas cervejas.	38
Tabela 5 - Análises físico-químicas das cervejas Brut IPA 1, Loira 1 e Thartaruga 1 no último dia de fermentação.	39
Tabela 6 - Turbidez inicial e final das cervejas Nautika 1, Rubi 2 e Extra 1 filtradas com filtros de cartuchos (5µm).	46
Tabela 7 - Turbidez inicial e final das cervejas Brut IPA 1 e Thartaruga 1 filtradas com filtros de terras diatomáceas.	48

Lista de Abreviaturas

PDH - Piruvato Desidrogenase

TCA – Ácido Tricarboxílico

ADP – Difosfato de Adenosina

ATP – Trifosfato de Adenosina

NAD⁺ - Nicotinamida Adenina Dinucleótido (oxidado)

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido (reduzido)

NADP⁺ – Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (oxidado)

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato (reduzido)

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

LOOH - Hidroperoxilinoico

LOX – Lipoxigenase

Ppb – Parte por bilhão

Ppm- parte por milhão

CoA – Coenzima A

OD – Oxigênio dissolvido

T2N – trans-2-nonenal

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

AR- Alcalinidade residual

1. Introdução

1.1. Estrutura da dissertação

Esta dissertação encontra-se dividida em 5 capítulos, tendo em conta os objetivos deste projeto. No primeiro capítulo encontra-se o enquadramento do trabalho desenvolvido em ambiente empresarial, bem como os objetivos. No segundo capítulo é apresentada a revisão bibliográfica do tema da dissertação, onde são descritas as matérias-primas da cerveja, o processo cervejeiro e o contributo do oxigénio na oxidação da cerveja. No terceiro capítulo são mencionados os materiais e métodos que se realizaram para a execução desta dissertação. No quarto capítulo, dividido segundo as etapas de produção da cerveja, fermentação e/ou maturação; *dry-hopping*; filtração e carbonatação, são apresentados os resultados das medições de oxigénio dissolvido (OD), bem como a sua análise e discussão. No último capítulo estão descritas as principais conclusões do trabalho realizado.

1.2. A empresa

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito de um estágio curricular em ambiente empresarial na empresa Essência D'Alma, Lda. Fundada em 2010 e sediada em Oliveira de Azeméis, a empresa é produtora de cerveja artesanal com a marca comercial de Vadia. A cerveja Vadia destaca-se no mercado cervejeiro com uma oferta alargada de cervejas (figura 1). As cervejas dividem-se em 4 gamas: 1) harmonização, constituída pelas cervejas Extra (*Doppelbock*), Orgânica (*American pale ale*), Thartaruga (*India pale ale*) e Nautika (*Baltic porter*); 2) original, constituída pelas cervejas Loira (*German pilsner*), Trigo, Preta (*dark lager*) e Rubi (*Märzen*); 3) especial, formada pelas cervejas *Portuguese Grape Lager*, *Oak Aged Doppelbock (Sour)* e *Ginja Oak Sour (Fruited sour)*; e 4) sem álcool, a cerveja Vadia 100, uma cerveja *lager* sem percentagem alcoólica. Para além da cerveja, também é produzida sidra de maçã e pera.



Figura 1 – Cervejas e sidras produzidas na empresa Essência D'Alma, Lda.

A diversidade dos seus produtos permitiu à marca obter o reconhecimento a nível nacional e internacional, conquistando inúmeras medalhas nos principais concursos internacionais, tais como *World Beer Awards*, *World Cider Awards*, *Brussels Beer Challenge* e *Concours International de Lyon*.

A marca de Cerveja Vadia é comercializada em todo o país, tendo como grande objetivo aumentar o sucesso da cerveja artesanal em Portugal e introduzir esta bebida nos hábitos do consumidor português¹.

1.3. Enquadramento e objetivo do trabalho

No mundo cervejeiro, e com o aumento da procura de produtos artesanais, é importante garantir a qualidade do produto até ao seu consumo. A cerveja artesanal é uma bebida com uma elevada estabilidade química, conseguindo conservar as suas características sensoriais até um ano, quando pasteurizada. No entanto, existem determinados componentes que quando presentes na cerveja podem afetar essa estabilidade, como o oxigénio.

O oxigénio dissolvido na cerveja pode ser um grande problema para a indústria cervejeira em quantidades elevadas. Este componente pode provocar a oxidação de vários constituintes da cerveja, em diferentes etapas da produção, desencadeando sabores e aromas

desagradáveis. Por esta razão, a empresa Essência D'Alma, Lda., decidiu investir num equipamento de medição de oxigénio dissolvido na cerveja, para acompanhar a evolução do oxigénio ao longo do processo cervejeiro.

A realização desta dissertação teve como objetivo a identificação das etapas do processo cervejeiro em que ocorre uma maior incorporação de oxigénio, permitindo implementar métodos para o controlo e/ou diminuição dos valores de oxigénio dissolvido nas cervejas. Para cumprir este objetivo foi realizada a medição do oxigénio dissolvido na bebida ao longo das principais etapas do processo cervejeiro.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Cerveja

A cerveja é uma das bebidas mais populares do mundo, e a sua produção já vem do início da urbanização e civilização no período neolítico². Existem vários estilos de cerveja disponíveis no mercado. As cervejas *lagers* são as mais comercializadas (94%), são cervejas claras, pouco amargas, de fermentação baixa e com um teor de álcool entre 4,5% e 5,5% em volume. As cervejas *ale* e *stout* equivalem a cerca de 3% do mercado cervejeiro. As *ale* são cervejas de alta fermentação, que diferem na cor e aprimoramento de lúpulo. Tendo em conta estas diferenças, elas podem ser classificadas em *mild ale*, *bitter ale*, *pale ale*, *india pale ale*, *brown ale*, *old ale*, *Scottish ale* e *Irish ale*. As cervejas *stout* são aromáticas, fortes, de malte tostado e de fermentação alta. Para além destes 3 estilos, existem as especialidades que incluem, principalmente, as cervejas de trigo, *white beer*, cervejas de frutas, sazonais e de sabor. Por fim existem as bebidas de malte, onde se inserem as cervejas sem álcool (com menos de 0,5% de álcool por volume) e as cervejas com baixo teor alcoólico (com até 2,8% de álcool por volume)². Dentro dos vários estilos de cervejas existentes, as cervejas são classificadas pelo teor alcoólico, cor, acidez, sabor, aroma, em relação ao seu “corpo”, e pelas características da espuma. A maneira que a cerveja é apreciada pelo consumidor é influenciada pela forma que é servida, a que temperatura, clareza, cor, sabor, aroma e se é acompanhada ou não por algum alimento³.

Os fabricantes de cerveja em todo o mundo produzem cerveja num nível tecnológico avançado, tentando manter sempre o método tradicional. Água, malte, lúpulo e leveduras são os ingredientes básicos para a produção desta bebida⁴. A cerveja é uma bebida alcoólica não destilada, obtida a partir da fermentação alcoólica do mosto do cereal maltado, geralmente malte de cevada⁵. A adição de outra matéria-prima amilácea ou de lúpulo é facultativa. O processo para a produção desta bebida consiste nas seguintes etapas: moagem, brassagem, filtração do mosto, ebulição, clarificação, arrefecimento, fermentação, maturação, filtração (facultativo) e carbonatação. Depois destes processos a cerveja é armazenada em cuba até ser engarrafada ou transferida para barris. Após o enchimento a cerveja é pasteurizada. Apesar de o processo cervejeiro seguir um padrão geral, este pode

variar em alguns aspetos, o que torna a cerveja uma bebida diversificada e de grande interesse para o consumidor^{3,4}.

2.2. Matérias-primas

2.2.1. Água

A água é o ingrediente maioritário usado na produção da cerveja. A composição e a qualidade desta matéria-prima tem grande influência na qualidade do produto final⁶. Tal como nas outras matérias-primas, o cervejeiro precisa pensar na água e na sua origem. Fontes de água diferentes tem perfis químicos diferentes, e portanto, diferentes benefícios para distintos estilos de cerveja⁷. Por exemplo, os iões presentes na água influenciam o processo de produção e a qualidade da cerveja. O ião de cálcio estabiliza a enzima α -amilase durante a brassagem e diminui o pH da mistura da brassagem. Por sua vez, o ião bicarbonato quando presente, pode provocar um aumento desse pH³.

A água deve ser potável, pura e livre de agentes patogénicos⁸. O facto de a água ser considerada própria para consumo, não garante que seja adequada para o uso na produção de cerveja. Se a água contiver cloro ou cloroaminas, gases dissolvidos ou compostos orgânicos voláteis, podem afetar adversamente o sabor da cerveja. Os sabores e aromas desagradáveis provenientes da água podem ser de mofo ou terra, enxofre, éster ou metálico⁷. Por esta razão, esta matéria-prima, antes de ser utilizada no processo cervejeiro, carece de uma análise, pelo menos, anual. O sabor, a cor, turbidez, o magnésio, cloro e cálcio são alguns dos componentes analisados, no entanto mais parâmetros podem ser sujeitos à análise⁹.

Na água existem sais dissolvidos, mas como são muito diluídos, não estão presentes como sais, mas quase exclusivamente como iões dissociados. Portanto é mais correto falar em iões dissolvidos. Os iões dissolvidos presentes na água podem ou não reagir com os componentes do malte, durante a brassagem. Desta forma, é possível separar os iões da água em iões quimicamente inativos ou quimicamente reativos. O cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de sódio, sulfato de potássio, entre outros, são exemplos de sais quimicamente inativos, que passam inalterados para a cerveja. Por sua vez, os iões quimicamente reativos reagem com os constituintes do malte afetando a sua acidez durante

a produção da cerveja. Cloreto de hidrogénio (HCl) e fosfato monopotássio (KH₂PO₄) são exemplos de iões quimicamente reativos⁶.

O ião de cálcio é um ião importante, a reação deste ião com os fosfatos do malte, durante a brassagem é um dos principais mecanismos para a diminuição do nível de pH da mistura (água e malte). Este ião protege, estabiliza e promove a atividade enzimática da mistura e ajuda na coagulação de proteínas, precipitação de oxalato (“pedra da cerveja”) e no metabolismo e floculação de leveduras^{9,10}.

A água tem um pH neutro, pois o conteúdo em iões de hidrogénio (H) são os mesmos que os iões hidroxilo (OH⁻)⁶. No entanto, o pH da mistura durante a brassagem é que tem maior importância para o processo cervejeiro. Assim, devemos controlar a reação entre a água e o malte, e o pH dessa mistura é uma medida do produto dessa reação. Esse pH vai ser importante porque influencia o pH final da cerveja e é um fator significativo para a atividade enzimática. O pH da mistura ideal usando água destilada ronda o 5.8, valor correspondente à mistura arrefecida⁷.

A dureza da água é uma propriedade desta matéria-prima, causada pela presença dos iões de cálcio e magnésio. Os resultados são expressos em graus de dureza (°dH), e é frequentemente medida com um teste do tipo quelante. Neste tipo de teste um agente químico, como o EDTA, é usado para ligar e precipitar todos os catiões da solução. A dureza total pode ser dividida em dureza de carbonato e não carbonato, o primeiro é Ca₂(HCO₃)₂ e Mg(HCO₃)₂ e o último CaCl₂, CaSO₄, MgCl₂, MgSO₄⁹. A água é classificada segundo a sua dureza, como podemos observar na tabela 2^{6,7,9}:

Tabela 1 - Classificação da água de acordo com a sua dureza. 1°dH = 10 mg CaO/L = 1 g CaO/hL ou 7,19 mg MgO/L (forma em que é definida a dureza da água na Alemanha).

°dH		Iões alcalino-terrosos por L
		mmol
<7	Suave	>1.3
7 a 14	Dureza média	1.3-2.5
14 a 21.3	Duro	2.5-3.8
>21.3	Muito duro	>3.8

Como já vimos anteriormente, o pH da mistura na brassagem é essencial para o pH da cerveja. Por isso, é importante encontrar um fator chave para entender o efeito da

composição e ajuste da água no processo cervejeiro. Esse fator é a alcalinidade residual (AR) que consiste na interação da dureza e da alcalinidade da água na mistura. A AR permite que os fabricantes de cerveja manipulem o pH do mosto para um valor igual ou inferior ao da água destilada, através da adição de sal de cálcio e magnésio. A AR pode ser calculada através da seguinte fórmula:

$$AR = \text{Alcalinidade} - \frac{\text{Dureza do cálcio} + 0.5(\text{Dureza do magnésio})}{3.5}$$

Um valor de AR positivo faz com que o pH da mistura da brassagem seja mais alto do que estaria usando água destilada. O inverso acontece quando o valor de AR é negativo. Assim, para o pH da mistura ser inferior ao da água destilada, o valor de AR deve ser negativo. Para evitar valores positivos, os cervejeiros podem adicionar sais de cálcio ou magnésio, adicionar ácido ou fazer uso da acidez natural de maltes escuros^{6,9}.

2.2.2. Cereais

A cevada, depois da água, é o segundo ingrediente mais abundante da cerveja. Este cereal tem a vantagem de a sua germinação ser facilmente ajustada durante a maltagem. Para além da cevada, existem outros cereais, como trigo, trigo com casca, centeio, espelta e triticale, que também podem ser usados na produção de cerveja. Estes cereais são adicionados, principalmente, juntamente com malte de cevada⁸.

O amido é o constituinte maioritário do grão, e é produzido durante a fotossíntese e armazenado como grânulos de amido no endosperma⁸. O amido consiste em cadeias de amilose e amilopectina que são constituídas por resíduos de glucose, no entanto as suas estruturas são diferentes. A amilose consiste em unidades de α -glucose ligada por ligações glicosídicas nas posições 1 e 4, sendo uma cadeia helicoidal não ramificada tornando a degradação enzimática mais difícil. O mesmo não se verifica com a amilopectina, que apresenta uma complexidade maior que a amilose. Para além das unidades de α -glucose ligadas nas posições 1 e 4, a amilopectina apresenta ligações no carbono 6 espaçadas de 15 a 30 unidades de glucose, o que lhe confere a capacidade de absorver água, facilitando a degradação enzimática das ligações proteicas durante a maltagem^{8,6}.

A celulose encontra-se, exclusivamente, na casca do grão e consiste em cadeias longas e não ramificadas de resíduos de glucose com ligações glicosídicas (β 1,4)⁸. A celulose não se dissolve em água, permanecendo intacta na maltagem e na fabricação da cerveja, não afetando a qualidade deste produto⁸. As hemiceluloses são constituídas por β -glucanas e arabinoxilanas que atuam como compostos estruturais conferindo rigidez às paredes celulares do endosperma⁸. As β -glucanas são importantes na produção da cerveja pois influenciam a viscosidade do mosto e da cerveja. As arabinoxilanas rodeiam as β -glucanas das paredes do amido mas o seu efeito não é tão importante na produção e qualidade da cerveja⁶. A quantidade de açúcares livres na cevada é residual, sendo o maioritário a sacarose⁶.

A cevada apresenta um teor proteico entre 10,5 a 11,5 % (tabela 3), em que um terço deste valor pode permanecer na cerveja final. As proteínas da cevada são classificadas em quatro grupos: glutelina, prolamina, globulina e albumina. As glutelinas são solúveis em bases fracas e passam inalteradas para o grão gasto. As prolaminas são solúveis em soluções alcoólicas e parte passa para os grãos já utilizados. As glubulinas dissolvem-se em soluções salinas diluídas e também no mosto. Por último, as albuminas são solúveis em água pura. Estes dois últimos grupos são importantes para as características coloidais da cerveja e da espuma^{6,8}.

A cevada possui cerca de 2% de lípidos, que consistem essencialmente em ácidos gordos. Os lípidos são depositados principalmente no embrião e na camada de aleurona e são conhecidos por poderem afetar negativamente a estabilidade da cerveja. Enzimas como a lipoxigenase oxidam ácidos gordos em hidroperóxidos e adicionam compostos com grupos carbonilos, como aldeídos, à cerveja. Alguns lípidos são necessários para a nutrição das leveduras^{2,6,11}.

Os minerais localizam-se no embrião e na camada de aleurona no endosperma, correspondendo a cerca de 4% da cevada. A maioria está presente em compostos orgânicos, tais como fosfatos, silicatos e sais de potássio. A cevada é rica em vitaminas e contém essencialmente vitaminas do complexo B (B_1 e B_2), vitamina C e E^{8,6}.

Os compostos fenólicos influenciam a cor, espuma, sabor e turbidez na cerveja. Quando presentes em grandes quantidades, originam sabores desagradáveis e amargos. Alguns compostos fenólicos como as antocianinas podem formar ligações com substâncias

proteicas, que têm um alto peso molecular, causando turvação da cerveja por precipitação^{6,8}.

Tabela 2 - Composição química da cevada⁶.

Composição Química	Porcentagem (%)
Hidratos de Carbono Totais	70-85
<ul style="list-style-type: none">• Açúcares• Amido• Celulose• Hemicelulose	
Proteínas	10,5-11,5
Lípidos	1,5-2
Material Inorgânico	2-4
Outras substâncias	1-2
<ul style="list-style-type: none">• Compostos fenólicos ou taninos• Vitaminas• Enzimas	

2.2.3. Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma trepadeira nativa das regiões temperadas da América do Norte, Europa e Ásia⁵. Esta planta é usada sobretudo como um agente de amargor, aromatizante e de estabilidade na cerveja. Confere a esta bebida amargor, sabores e aromas florais, frutados ou cítricos^{5,8}. Tradicionalmente, também é adicionado devido aos seus efeitos de conservação⁸. Para a fabricação da cerveja, são usados as flores do lúpulo frescas que podem ser secas e processadas, para aumentar o seu tempo de conservação⁶.

O lúpulo é constituído por substâncias amargas, óleo essencial, compostos fenólicos, proteínas, minerais e outras substâncias sem importância do ponto de vista tecnológico da fabricação da cerveja. Os três grupos especialmente interessantes são as substâncias amargas, óleo de lúpulo e compostos fenólicos⁶. As substâncias amargas constituem cerca de 10 a 20% do seu peso seco⁸, e os α -ácidos e β -ácidos são os seus componentes mais importantes. Os α -ácidos são os compostos mais relevantes para o amargor da cerveja, sendo os mais abundantes as humulonas. Estes compostos são inicialmente insolúveis, mas durante

a ebulição do mosto são transformados em iso- α -ácidos solúveis em água, através da isomerização dos α -ácidos (figura 2)¹².

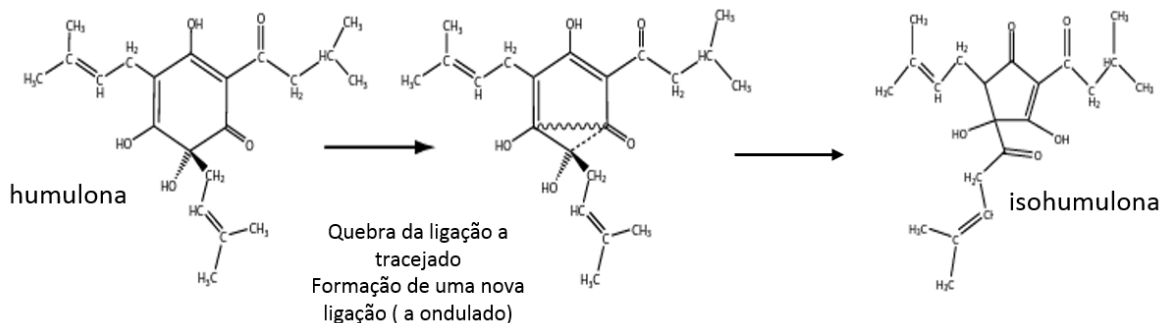


Figura 2 - Isomerização do α -ácido humulona⁷.

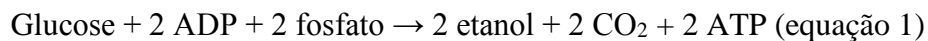
Os iso- α -ácidos e os seus derivados tem uma contribuição significativa para um potencial amargor. A contribuição dos β -ácidos no amargor é baixa, devido à baixa solubilidade que apresentam no mosto e na cerveja. Para além de conferir um amargor à cerveja, estas substâncias melhoram a estabilidade da espuma, a digestibilidade fisiológica e o poder bacteriostático. O lúpulo apresenta na sua constituição cerca de 1,2% de óleos essenciais. Estes são responsáveis pelo aroma, em que mais de 300 substâncias voláteis foram identificadas. Por último, temos os compostos fenólicos que correspondem a 5% da matéria seca do lúpulo. Os compostos fenólicos estão envolvidos na formação de turbidez, e contribuem para a cor e sabor da cerveja^{8,6}.

Na cervejeira o lúpulo pode ser usado de várias maneiras diferentes com vantagens e desvantagens, em que a escolha da forma depende, de onde os lúpulos são usados e dos resultados finais pretendidos. O lúpulo pode ser usado fresco, na forma de *pellets* ou *plugs*. O lúpulo fresco confere à cerveja um teor de aroma maior, no entanto provoca perdas do mosto, pois o lúpulo fresco absorve algum mosto. Também os *plugs* provocam perdas do mosto, no entanto conseguem manter a frescura do lúpulo por mais tempo. Por último, os *pellets* são vantajosos na facilidade do seu armazenamento e por não promoverem perdas do mosto. Como desvantagem apresentam custos mais elevados e o seu aroma é menor que as restantes formas⁵.

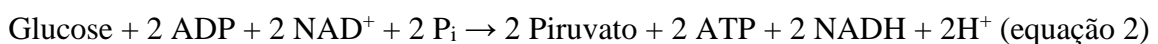
2.2.4. Leveduras

A levedura é um microrganismo unicelular, que se reproduz vegetativamente por gemulação². Este microrganismo tem a capacidade de obter energia aerobicamente, (respiração) ou anaerobicamente (fermentação)⁶. Na produção da cerveja as leveduras são cruciais para que ocorra a fermentação do mosto pois convertem os açúcares simples, como glucose e maltose, em álcool, dióxido de carbono e outros compostos que conferem aroma e sabor¹³.

O mosto é uma fonte rica de nutrientes para a levedura, contém açúcares fermentáveis (frutose, glucose, sacarose, maltose e maltotriose), nitrogénio assimilável, minerais e vitaminas. As leveduras precisam também de oxigénio, que normalmente é fornecido por aeração, durante o processo cervejeiro². Após a inoculação das leveduras no mosto, as células absorvem rapidamente o oxigénio e começam a usar o açúcar e os nutrientes do mosto¹³. Como as leveduras têm maior facilidade em utilizar monossacarídeos, começam por utilizar primeiro a glucose e a frutose seguida pela sacarose, maltose e maltotriose². A levedura leva a glucose e a frutose para a célula através da difusão facilitada sem gastar energia metabólica¹³. A absorção de sacarose ocorre simultaneamente. Por sua vez, a absorção da maltose e maltotriose é realizada por transporte ativo². A captação de oxigénio ocorre rapidamente por difusão facilitada, e a levedura geralmente esgota os níveis de oxigénio no mosto dentro de 30 minutos, após a inoculação¹³. O processo de fermentação ocorre em condições anaeróbicas, em que a glucose é metabolizada em etanol e dióxido de carbono (CO₂). A equação geral (equação 1) da conversão de açúcar em etanol pela levedura é:



O processo de fermentação mais pormenorizado divide-se em duas partes: a conversão da glucose em piruvato e a de piruvato em etanol^{2,13}. A equação 2 pormenoriza a primeira etapa do processo:



Na segunda etapa (figura 3), a conversão do piruvato em etanol acontece dentro da célula (no citosol), onde a molécula de glucose é convertida em duas moléculas de piruvato, pela glicólise. O piruvato tem dois caminhos possíveis: entrar na mitocôndria onde se decompõe em CO₂ e água (respiração aeróbica) ou permanecer no citoplasma, onde a célula o converte em acetaldeído e por seguinte em etanol¹³.

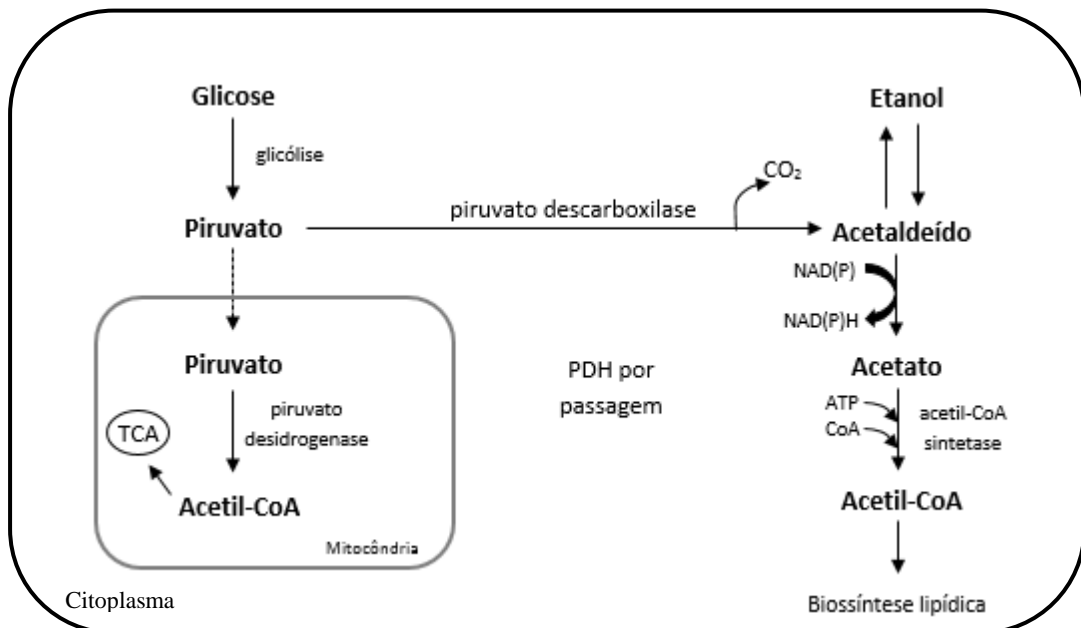


Figura 3 – Esquematização da segunda etapa da fermentação, a conversão do piruvato em etanol. PDH: piruvato desidrogenase. TCA- ácido tricarboxílico².

Para a escolha da levedura adequada é necessário analisar os seguintes critérios: o comportamento da fermentação (fermentação alta ou baixa), floculação (a levedura pode flocular no topo ou depositar-se no fundo), o desempenho na fermentação, a produção e degradação de produtos secundários e a intensidade de propagação⁸.

Geralmente, dois tipos de leveduras *Saccharomyces spp.* estão envolvidas na fermentação da cerveja, sendo que se classificam em leveduras de fermentação alta (ou *ale*) e leveduras de fermentação baixa (ou *lager*)². As leveduras *ale* são geneticamente mais diversificadas, fermentam a temperaturas mais altas (entre os 18 e 24°C) e floculam, o que facilita a sua recolha. A levedura *lager* fermenta a temperaturas mais baixas (entre os 8 e 14°C) e depositam no fundo, devido aos flocos que se formam por se associarem¹⁴.

2.3. O processo cervejeiro

A produção de cerveja é um processo bem conhecido, que começa muito antes de o malte chegar à cervejeira. A cevada é sujeita a um processo que também influencia a qualidade da cerveja. O cereal é embebido em água e drenado para posteriormente germinar. A germinação do cereal tem como principais objetivos, a produção de enzimas hidrolíticas, a quebra controlada das paredes celulares e proteínas da matriz, a hidrólise de certos componentes de cevada, por exemplo, proteínas para formar amino nitrogenado livre (FAN), que é quantidade de nitrogénio derivado dos aminoácidos, e produzir malte verde equilibrado e bem modificado para a secagem. No final da fase de germinação, há a fase de secagem em que a germinação é interrompida por calor a temperaturas controladas, com a finalidade de reduzir o teor de humidade, conservar os complexos enzimáticos desenvolvidos durante a maltagem e desenvolver características de sabor e aroma^{4,5,2}.

O processo de produção da cerveja divide-se essencialmente em quatro passos: preparação do mosto, fermentação, maturação e filtração⁸. Na figura 4 podemos ver a sequência habitual das etapas de produção da cerveja.

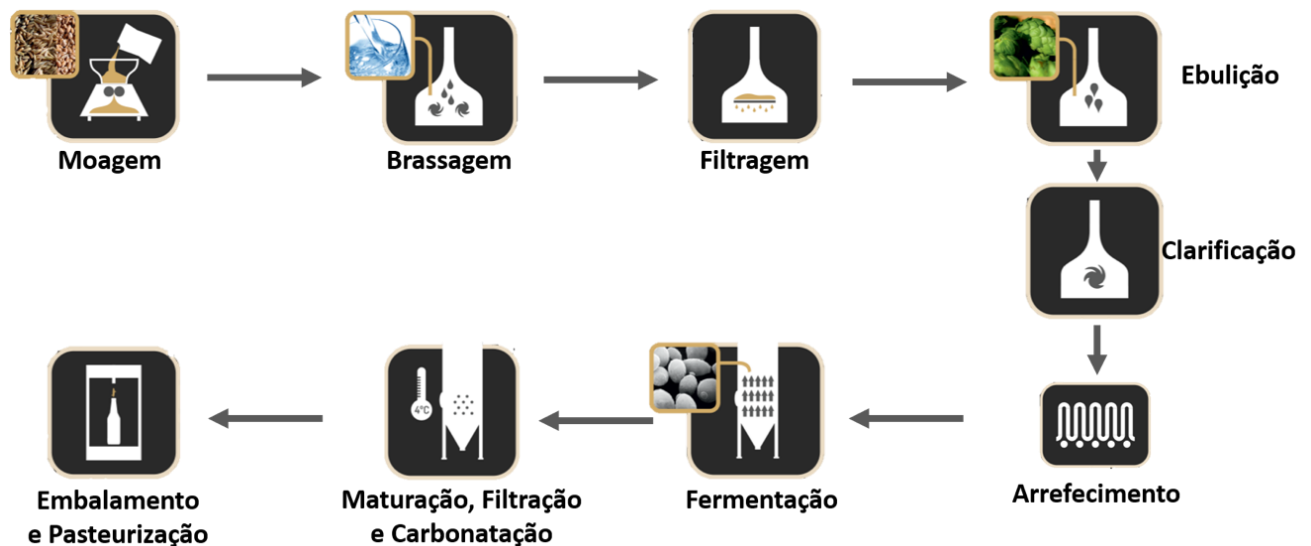


Figura 4- Representação esquemática do processo cervejeiro¹.

Na preparação do mosto, o malte é previamente moído na indústria cervejeira. A moagem do malte aumenta a área de contacto, produzindo partículas mais facilmente extratáveis e solúveis^{8,4}. Na brassagem, o malte moído é imerso em água quente. Este

processo ocorre num tanque de brassagem, que possui um agitador usado para garantir uma mistura eficiente e homogênea. Normalmente, são usados 200 a 400 litros de água para 100 kg de malte, dependendo do método de fermentação e da densidade da cerveja produzida¹⁵. A brassagem vai reativar e acelerar a atividade enzimática, gelatinizar os grânulos de amido, tornando-os suscetíveis à digestão pelas amilases. A α -amilase quebra ligações α -1,4 de amilose e amilopectina, convertendo o amido em açúcares fermentáveis e dextrinas não fermentáveis, num curto período de tempo. Este processo é regulado pela temperatura, tempo de permanência, valor de pH e proporção de água. A temperatura a que ocorre deve ser de 60-63 °C durante 30 a 45 minutos. Após este período, aquece-se a 1 °C/min até atingir os 72 °C^{8,5,4}.

A seguir à brassagem o mosto é transferido para um tanque de filtração, onde é separado a parte insolúvel (dreche). Esta filtração é realizada com um filtro de *lauter* e filtro de mistura. Inicialmente, o líquido escorre (extração de 16-20% do mosto) e de seguida, a dreche é lavada várias vezes com água quente para obter o mosto. A temperatura beneficia o processo e o seu aumento acelera a filtração, ao diminuir a viscosidade do mosto. No entanto, temperaturas acima dos 80 °C devem ser evitadas para não ocorrer o desgaste dos β -glucanos reativos ao iodo e a destruição de α -amilase. Após a separação do mosto da parte insolúvel (dreche), o mosto é transferido para um tanque onde é fervido com lúpulo, geralmente por 1 a 2 horas².

Durante a ebulição, o mosto sofre várias alterações, tais como, diminuição do pH do mosto, destruição das formas vegetativas de micróbios, isomerização e extração de alguns dos ácidos do lúpulo, desnaturação e inativação de enzimas residuais transportadas do mosto e a desnaturação e coagulação de proteínas. Ocorre ainda a evaporação da água, reduzindo o volume 7 a 10%³ e também a formação de novos sabores, compostos de aroma e alteração da cor, devido, principalmente às reações de *Maillard*³. No final da ebulição, o mosto apresenta complexos insolúveis que são removidos no *whirlpool*⁸. O *whirlpool* é um tanque no qual o mosto quente é feito fluir em círculo, para que os sólidos se acumulem no centro e ocorra a clarificação¹². O mosto clarificado é arrefecido para evitar a sua oxidação⁵. Por fim, o mosto é transferido para uma cuba de fermentação onde ocorre a adição das leveduras, por um processo denominado *pitching*. Após esta adição o mosto é chamado de cerveja jovem²³.

A fermentação é a etapa que permite a conversão do mosto em cerveja, através da ação das leveduras. Este é um processo decisivo e de grande importância para a bebida, como tal, é necessário ter em atenção alguns fatores. Em primeiro lugar, é necessário inocular uma concentração de leveduras suficiente^{5,13}. A levedura inoculada pode ser de pacote ou recuperada de outras fermentações, desde que apresente uma boa viabilidade e vitalidade^{5,13}. A membrana da levedura controla o que entra e sai da célula, desta forma, a sua viabilidade é uma condição necessária para um início satisfatório da fermentação¹⁶. As condições do mosto também devem ser verificadas. A disponibilidade de oxigénio é um fator limitante para o crescimento da levedura, que para quando os níveis de esteróis se esgotam. Para que o mosto apresente o nível de oxigénio necessário para o crescimento da levedura, procede-se à injeção de oxigénio⁵. Este oxigénio associa-se à síntese de esteróis e ácidos gordos pela levedura, etapa esta que é essencial para a manutenção da viabilidade desta célula. A adição de oxigénio deve ser efetuada no mosto frio, e em quantidades controladas¹⁶. Para além do oxigénio fornecido por aeração, o mosto deve apresentar bons níveis de nutrientes, como nitrogénio, vitaminas, fósforo e vestígios de metais^{5,13}. É necessário também controlar a temperatura, pois o aumento da temperatura aumenta a velocidade das reações e, conseqüentemente, maiores serão as concentrações de produtos secundários, que nem sempre são desejáveis^{5,8}.

Após a inoculação da levedura, existe a adaptação às condições do mosto e a levedura começa a captar oxigénio, minerais e aminoácidos (nitrogénio) do mosto e a desenvolver proteínas a partir dos aminoácidos. Esta etapa denominada fase *lag*, é uma fase em que não se observa nenhuma atividade visual⁵. No início desta fase a levedura usa as suas reservas de glicogénio, para além do oxigénio e lípidos provenientes do mosto, para sintetizar esteróis e formar membranas celulares. Uma vez que as paredes celulares são permeáveis, a levedura pode começar a metabolizar o amino nitrogénio e açúcares no mosto como alimento, e assim ocorra a sua reprodução. A oxigenação do mosto efetuada vai reduzir a duração desta fase, permitindo que a levedura se reproduza rapidamente, a níveis que garantem uma boa fermentação. Isto acontece porque os processos metabólicos aeróbicos são mais eficientes do que os anaeróbicos. Quando o oxigénio é consumido, a levedura muda as vias metabólicas, e começa o metabolismo anaeróbico de conversão do açúcar em álcool^{5,13}. É neste momento, que a levedura sai da fase *lag* e entra na fase exponencial de crescimento. O fermento começa a consumir os açúcares da solução e a produzir etanol, compostos de aroma

e grandes volumes de CO₂. Esta fase é marcada por uma fermentação vigorosa e a formação de uma camada espumosa (cabeça de *krausen*) à superfície da cerveja. Constituída por proteínas da levedura e do mosto, esta camada espumosa começa a diminuir conforme a fase exponencial termina, devido à estabilização das leveduras^{5,13}. Esta fase termina quando a maioria dos açúcares do mosto são convertidos em álcool¹³.

A fase secundária permite o consumo lento dos restantes açúcares. A levedura começa a degradar os açúcares mais complexos, como a maltotriose e a eliminar grande parte do diacetilo e acetaldeído produzidos durante a fermentação (fase primária). Esta fase é caracterizada pela maturação da cerveja^{5,13}. A concentração total de diacetilo é usada para avaliar a maturidade da cerveja fermentada e o seu valor deve ser abaixo do limiar de perceção sensorial². Durante a maturação, a cerveja é condicionada a frio por um período mínimo de 3 dias para possibilitar a estabilização e a floculação natural da levedura¹⁰. Esta etapa pode durar entre uma a várias semanas, dependendo das condições a que o processo é realizado e do tipo de cerveja produzido¹⁰.

No final da maturação a cerveja apresenta milhares de células de leveduras e outras partículas que devem ser removidas. A filtração é um processo de separação, no qual as células de levedura e outros materiais causadores de turbidez presentes na cerveja são removidos. Esta etapa tem como principal objetivo a remoção dessas substâncias para a diminuição da turbidez desta bebida, tornando a cerveja mais límpida e estável⁶.

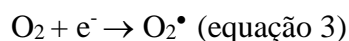
O dióxido de carbono (CO₂) é um elemento muito importante na cerveja. Confere-lhe brilho, sensação na boca e nitidez associadas as suas propriedades como gás ácido. O controlo da concentração de CO₂ na cerveja é importante para garantir a qualidade do produto. Apesar do dióxido de carbono ser um gás produzido naturalmente na fermentação primária e secundária, maioria das cervejeiras realiza o processo de carbonatação depois de a cerveja ser filtrada, para assim ter um maior rigor na concentração de CO₂ e adaptá-lo ao gosto do consumidor. Esta etapa consiste na injeção de uma quantidade controlada de CO₂ o mais puro possível, que vai depender da temperatura e da pressão da cerveja. Um aumento da pressão leva a um aumento no peso de CO₂ dissolvido na cerveja, enquanto um aumento da temperatura, provoca uma diminuição na quantidade deste gás³.

Depois destes processos a cerveja é armazenada em cubas até ser embalada em barris, lata ou garrafa. A cerveja é habitualmente pasteurizada, normalmente já embalada, para prolongar a sua vida útil¹⁰.

2.4. As reações do oxigénio na cerveja

O oxigénio no estado fundamental ($^3\text{O}_2$) é uma molécula estável, que pode reagir e ser convertida em radicais livres ou espécies reativas de oxigénio (ROS). Essa conversão pode ser causada por iões metálicos de transição, outras espécies de radicais e, alternativamente, por enzimas como a lipoxigenase (LOX)^{17,18}. O oxigénio, os radicais livres e ROS podem ser responsáveis pela deterioração da cerveja. Vários átomos de oxigénio reativos são produzidos durante o processamento e armazenamento da cerveja, iniciando reações de oxidação, levando à formação de sabores desagradáveis e turbidez¹⁹.

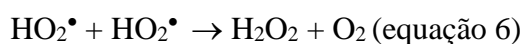
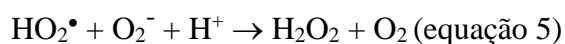
O oxigénio é uma molécula com 2 eletrões desemparelhados de rotação paralela. Para que esta molécula reaja com outras moléculas, o oxigénio deve encontrar eletrões de rotação oposta¹⁸. Quando o oxigénio adquire um único eletrão produz o radical superóxido (O_2^\bullet) (equação 3)



Este radical formado pode ter vários destinos dependendo de que moléculas encontra. Na cerveja, é provável encontrar primeiro a molécula de água e depois a de etanol. O radical per-hidroxilo (HO_2^\bullet) é muito mais reativo que o O_2^\bullet . O pKa para esse equilíbrio (equação 4) é de 4,8 e devido ao pH da cerveja, a maioria do ião superóxido encontra-se na forma protonada, ou seja, na forma de HO_2^\bullet (equação 4)¹⁷.



Qualquer sistema que produz superóxido também produz peróxido de hidrogénio (H_2O_2) pela enzima superóxido dismutase, por dismutação (equação 5 e 6)^{17,3}.



A interação do peróxido de hidrogénio ou O₂ com um ião metálico de transição (como ferro ou cobre) gera o radical livre hidroxilo (OH•), que apresenta uma grande reatividade²⁰, acelerando a produção de aldeídos e a degradação das iso-humulonas²¹. Quando o peróxido de hidrogénio reage com um ião de ferro estamos perante uma reação de *Fenton*²¹. Na reação de *Fenton*, o Fe(II) é oxidado em Fe(III) pelo peróxido de hidrogénio, formando um radical hidroxilo (equação 7). O Fe (III) reage com uma molécula adicional de H₂O₂, gerando 2 prótons e um ião superóxido¹⁹.

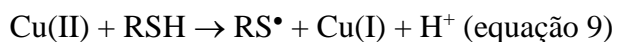


O radical livre hidroxilo pode também ser gerado por ação do metal cobre, numa reação análoga, e nesse caso estamos perante uma reação de *Haber-Weiss*²¹.

Os radicais hidroxilo formados pelas reações de *Fenton* ou *Haber-Weiss* podem também provocar a oxidação dos constituintes da cerveja em aldeídos e cetonas ou iniciar uma sequência de reações radicalares secundárias²¹. Outro ião metálico, o cobre, também é capaz de promover a formação de espécies oxidantes prejudiciais na presença de um agente redutor (RH₂) que recicla o ião metálico através do seu estado de valência mais baixo (equação 8):¹⁸



Os radicais livres formados pela conversão do oxigénio podem, por sua vez, produzir outros radicais livres. O enxofre, tal como o oxigénio, também pode reagir e formar radicais livres. E esses radicais livres formados ao reagir com o oxigénio originam radicais livres, como se pode ver nas seguintes equações (equação 9 e 10)¹⁷:



Estes compostos são alguns dos radicais livres ou ROS que o oxigénio forma, e que dão origem a compostos que podem ser prejudiciais para a cerveja. Para além dos referidos anteriormente, o oxigénio singleto também pode ser responsável pela deterioração da cerveja. Trata-se de uma molécula não radical que é capaz de captar um átomo de hidrogénio a partir de um ácido gordo insaturado, desencadeando a auto-oxidação, e por sua vez a formação de compostos indesejáveis, como hidroperóxidos e aldeídos, durante o processamento e armazenamento da cerveja^{18,22}.

2.4.1. O oxigénio nas diferentes etapas da fabricação da cerveja

O oxigénio é prejudicial na cerveja, no entanto pode ser benéfico em algumas etapas de produção. Tudo depende da fase do processo em que está presente e em que quantidades²¹. Ele é crucial na maltagem, para a germinação do embrião da cevada, e indispensável para a levedura no processo de fermentação. A levedura precisa deste elemento químico para sintetizar esteróis e ácidos gordos insaturados para a biossíntese da membrana celular⁵, permitindo que a fermentação proceda satisfatoriamente. Ainda referente aos benefícios do oxigénio, ele é um elemento essencial para a oxidação e polimerização de compostos fenólicos, tornando-os insolúveis, o que contribui para a clarificação do produto final²¹. Somente na maltagem e na fermentação é que o oxigénio é benéfico no processo. Após a fermentação, o oxigénio deve ser eliminado ou minimizado na cerveja. Mesmo na fermentação é importante ter em atenção o uso do oxigénio, pois o seu uso inadequado causa a instabilidade do sabor, aroma e cor do produto final²³.

2.4.1.1. Oxigénio na maltagem e no início da produção de cerveja

As condições durante a brassagem, etapa inicial da produção da cerveja, podem favorecer reações oxidativas. A mistura física do malte moído e a água com agitação contínua pode introduzir eficientemente oxigénio atmosférico no mosto. Temperaturas não

adequadas (fora do intervalo, geralmente, entre 35 a 75°C) pode não garantir a solubilidade do oxigénio²⁴.

Durante a maltagem, uma das reações de oxidação mais relevantes que pode ocorrer é a oxidação de ácidos gordos insaturados pela enzima lipoxigenase (LOX) (EC 1.13.11.12). Esta enzima catalisa a oxidação de ácidos gordos insaturados com estruturas de 1,4-cis-cis-pentadienos para formar hidroperóxidos conjugados²⁵. Na cevada podemos encontrar 2 tipos de LOX, a LOX-1 e a LOX-2. A LOX-1 converte principalmente o ácido linoleico em 9-hidroperóxidos, enquanto a LOX-2 produz principalmente 13-hidroperóxidos (figura 5)²⁶. Estas 2 enzimas são muito sensíveis ao calor, sendo a LOX-1 mais resistente. Esta característica resulta na inativação da LOX-2 durante a secagem da cevada, fazendo com que a atividade que possa ocorrer no restante processo seja da responsabilidade da LOX-1²⁶. A LOX-1 está envolvida no processo de oxidação enzimática através da formação de precursores de compostos indesejáveis da cerveja durante a maltagem e moagem. Um desses compostos é o trans-2-nonenal (T2N), responsável pelo sabor desagradável típico a cartão envelhecido que aparece durante o envelhecimento da cerveja²⁵⁻²⁷.

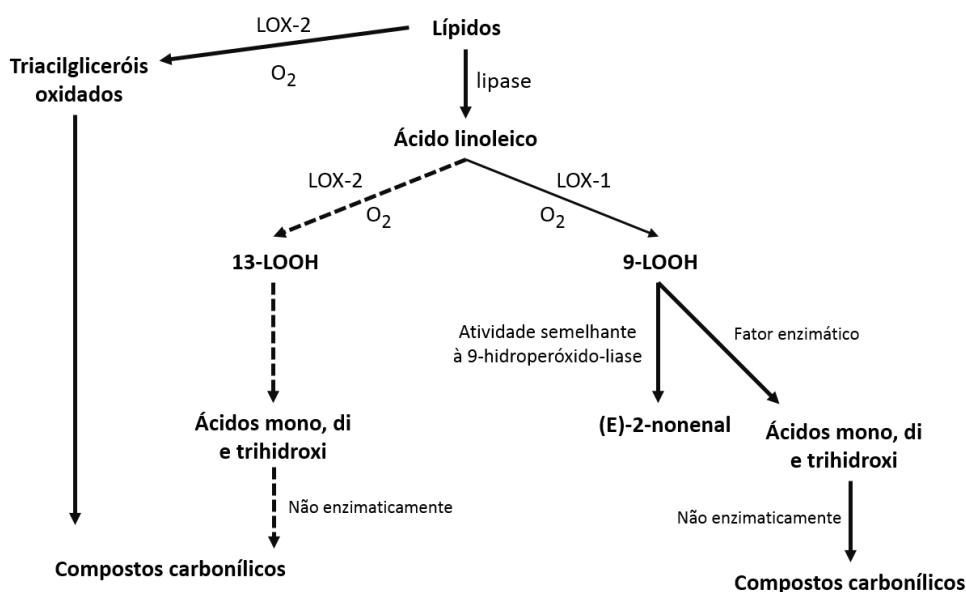
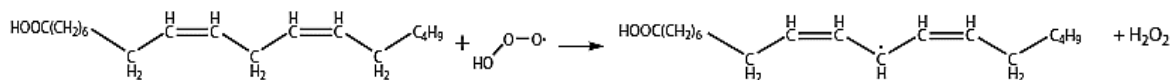


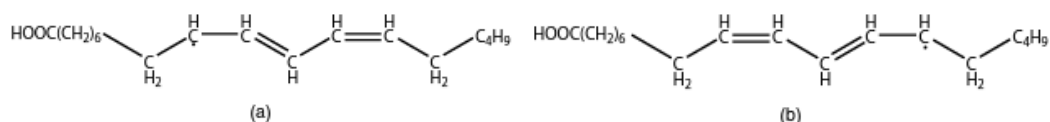
Figura 5 - Visão geral das vias de oxidação enzimática atualmente conhecidas do ácido linoleico²⁸.

A oxidação de ácidos gordos também pode ocorrer através da auto-oxidação. Esta reação é iniciada pela captura de um átomo de hidrogénio da molécula de radicais livres,

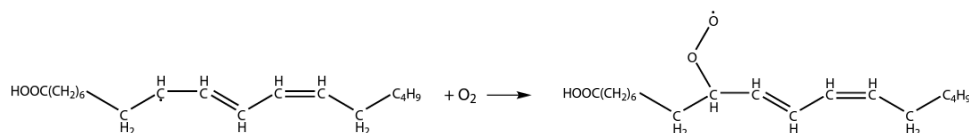
normalmente o hidroperoxilo (HOO^\bullet), sendo que o produto do radical livre possui um eletrão não emparelhado no carbono 11²⁸.



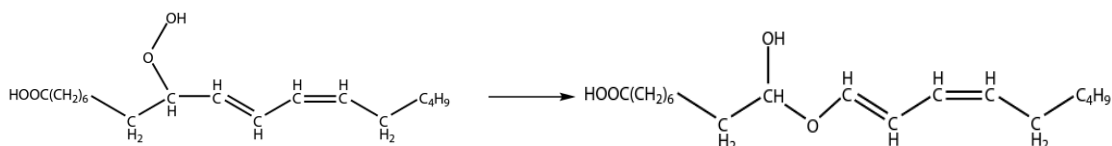
Portanto, este é o local inicial do hidrogénio capturado, levando à formação de um radical pentadienilo, que é estabilizado pela formação de 2 hidroperoxidos nas posições 9 (a) e 13 (b) (9-LOOH e 13-LOOH)^{12,28}.



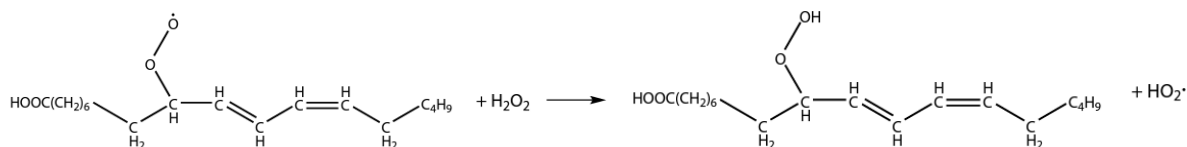
Os hidropéroxidos podem ainda ser sujeitos a processos de oxidação pela adição de oxigénio, levando à formação de compostos como o T2N. Quando o oxigénio é adicionado ao radical livre (hidroperoxido) forma um radical peroxilo (ROO^\bullet)¹².



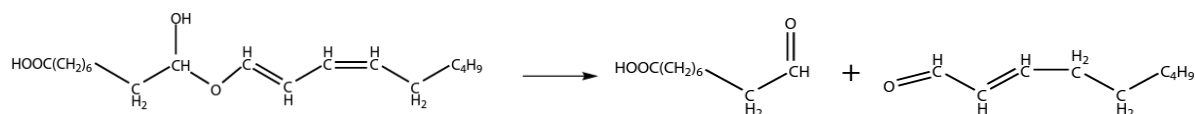
O radical formado captura um átomo de hidrogénio do H_2O_2 , gerado numa etapa anterior, originando uma molécula de hidroperoxido (ROOH)¹².



O radical HOO^\bullet é regenerado¹².



Como o ROOH não é muito estável, pode reorganizar-se para dar um hemiacetal de dupla ligação mais estável. Por fim, ocorre a quebra do hemiacetal originando o trans-2-nonenal como produto¹².



Desta forma, a maltagem é um processo em que podem ocorrer reações de oxidação enzimáticas ou reações de auto-oxidação. É uma etapa do processo cervejeiro que merece a atenção para o controlo da oxidação da cerveja¹².

2.4.1.2. Oxigénio na fermentação e aeração do mosto

A aeração do mosto consiste no processo de adicionar pequenas quantidades de oxigénio ao mosto da cerveja. Este processo é controverso, pois há quem defenda que a aeração do mosto é prejudicial para a qualidade da cerveja. A adição de oxigénio pode tornar a fermentação mais rápida, o que pode originar uma elevada produção de subprodutos da fermentação, como o diacetilo e provocar a oxidação dos constituintes do mosto^{13,29}. Essa oxidação vai levar à formação de ROS, que pode levar à morte celular. Para se protegerem contra esses danos oxidativos, as células possuem mecanismos de defesa, incluindo enzimas, como peroxidases, catalases e superóxido dismutases, e antioxidantes, como glutathione e vitaminas³⁰. Estes fenómenos levam a alterações desagradáveis na qualidade do mosto, nomeadamente no sabor e cor do produto final^{13,29}. Apesar disso, há quem defenda que a aeração do mosto é benéfica e a maioria dos cervejeiros opta por realizar este processo.

O oxigénio é um fator crítico para o crescimento da levedura¹³. Estes organismos necessitam desta molécula para a sua reprodução. Como o oxigénio é essencial para a biossíntese de ácidos gordos insaturados e ergosterol, este deve ser adicionado ao mosto no início da fermentação, para fornecer os níveis necessários de oxigénio²⁹. No entanto, a aeração do mosto não deve ser realizada quando a temperatura do mosto é elevada. Quando adicionamos oxigénio ao mosto quente, este reage quimicamente com diferentes compostos do mosto que se vão decompor, libertando oxigénio atómico para a cerveja. Esse composto pode oxidar os álcoois e os compostos do lúpulo, produzindo sabores e aromas desagradáveis, como o de maçã verde, devido ao acetaldeído, álcoois ou outros compostos. A temperatura geralmente aceita para evitar a oxidação do mosto é de aproximadamente 37 °C. Portanto, é importante arrefecer o mosto e realizar a aeração no mosto frio^{5,13}. Como podemos analisar na tabela 3, existe uma mais-valia no uso da aeração do mosto frio em comparação à aeração do mosto quente.

Tabela 3 - Vantagens e desvantagens da aeração do mosto quente e frio³¹.

	Aeração do mosto quente	Aeração do mosto frio
Vantagens	<ul style="list-style-type: none"> • Esteriliza o ar; • Melhor mistura através do refrigerador do mosto. 	<ul style="list-style-type: none"> • Melhor solubilidade em oxigénio no frio; • Menor risco de oxidação do mosto; • Pouco oxigénio é consumido devido a reações químicas com o mosto; • Menor risco de sabores e aromas desagradáveis e instabilidade.
Desvantagens	<ul style="list-style-type: none"> • Menor solubilidade do oxigénio; • Risco da oxidação do mosto; • Parte do oxigénio será consumido por reações de oxidação do mosto; • Maior risco em desenvolver sabores e aromas oxidados na cerveja. 	<ul style="list-style-type: none"> • O ar deve ser estéril antes da adição; • É necessário um sistema de mistura de oxigénio separado.

O processo de aeração consiste na adição de quantidades relativamente altas de oxigénio (8 a 10 mg/L) no mosto no início da fermentação. Pode-se concluir que a aeração do mosto frio (10 a 25°C) não causa danos para a cerveja, e que quando realizada nas condições adequadas, ajuda no processo da fermentação²⁹.

2.4.1.3. Oxigénio no envelhecimento da cerveja

O oxigénio, após a fermentação, quando entra em contacto com determinados componentes desta bebida pode ser prejudicial para a qualidade da cerveja. A deterioração do sabor da cerveja embalada é um desafio enfrentado pelo mundo cervejeiro. Dentro das numerosas reações relacionadas com esta deterioração, a oxidação foi identificada como uma das mais importantes. Assim, o objetivo é obter a menor percentagem possível de oxigénio dissolvido (OD) na cerveja embalada para reduzir as reações químicas responsáveis pela oxidação e degradação do sabor da cerveja, durante o envelhecimento³². Desta forma, recomenda-se que os níveis de OD na cerveja já engarrafada sejam inferiores a 50 ppb, para reduzir os efeitos negativos na cerveja³².

O oxigénio causa uma rápida deterioração do sabor da cerveja durante o envelhecimento. Uma das causas principais é a formação de ROS e radicais livres. Comumente, as ROS (O_2^{\bullet} , HOO^{\bullet} , H_2O_2 e HO^{\bullet}) reagem com todos os tipos de moléculas orgânicas da cerveja, como compostos fenólicos, iso-humulonas e álcoois, advindo em diversas alterações no perfil sensorial da cerveja. Os iões hidroxilo formados pelas reações de *Fenton* ou *Haber-Weiss* podem oxidar os constituintes da cerveja em aldeídos ou cetonas, ou iniciar uma série de reações radicais secundárias que podem oxidar ainda mais os compostos da cerveja. O radical superóxido e o oxigénio singlete podem diminuir os níveis de antioxidantes na cerveja embalada e torná-la mais suscetível ao efeito do oxigénio na embalagem final²¹. No envelhecimento, a concentração de radicais livres aumenta com o aumento da concentração de iões de ferro/cobre, de oxigénio e com temperaturas de armazenamento altas. Desta forma, o oxigénio (de forma direta), as ROS e os radicais livres vão desencadear reações que provocam a deterioração da cerveja²⁸.

Um dos grandes problemas durante o envelhecimento da cerveja é a formação de aldeídos³³. Este tipo de compostos contribui para a deterioração da cerveja, por serem sensíveis ao envelhecimento e ter baixos limites de perceção sensorial. O benzaldeído, metional, 2-metilpropanal, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal e fenilacetaldeído são exemplos de aldeídos³⁴, sendo o metional (aroma a batata cozida) e o fenilacetaldeído (aroma a doce, semelhante ao mel) mais relevantes para o perfil sensorial da cerveja envelhecida²⁸. Os sabores que os aldeídos proporcionam à cerveja variam conforme o composto e a concentração, mas os mais comuns são o sabor e aroma semelhante a banana, queijo, verniz e relva. Os aldeídos podem surgir na cerveja envelhecida através da degradação de *Strecker*, ou devido à oxidação. A degradação de *Stecker* é uma reação de transaminação que ocorre entre um aminoácido e um α -dicarbonilo produzindo dióxido de carbono (CO_2), amoníaco (NH_3) e um aldeído^{34,21}. Também o oxigénio pode estar envolvido na formação de aldeídos, por oxidação dos álcoois superiores. Foi demonstrado que a formação destes compostos é promovida pela adição de H_2O_2 ou pela exposição ao oxigénio³⁴. A presença de valores mais elevados de oxigénio ou ROS no espaço livre da garrafa resulta num aumento destes aldeídos³⁵.

Os álcoois superiores mais relevantes nesta bebida, e que estão sujeitos à oxidação, pelo oxigénio, são: o etanol, 2-metil-propanol, 2-metil-butanol, 3-metil-butanol e 2-fenil-etanol. A oxidação direta de álcoois superiores por oxigénio molecular não ocorre, este

processo só é possível na presença de melanoidinas²⁸. Foi proposto um mecanismo de reação na qual os álcoois superiores transferem elétrons para grupos carbonílicos reativos de melanoidinas. No entanto, os compostos formados desta reação não mostraram grande influência em termos de sabor. Ao contrário do oxigênio molecular, as ROS podem reagir diretamente com os álcoois superiores. Um exemplo é o radical hidroxilo que ao reagir com o etanol forma, como produto principal, o acetaldeído (figura 6)²⁸.

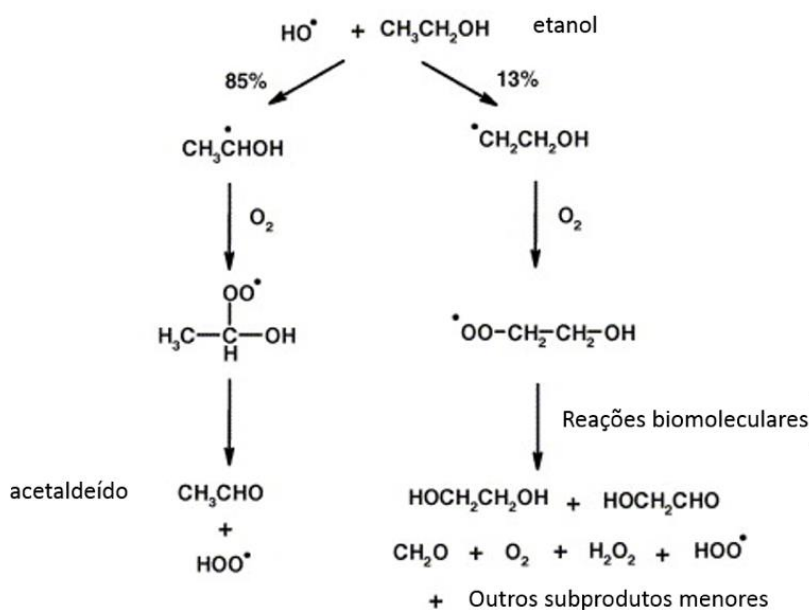


Figura 6 - Reação de etanol com o radical hidroxilo na cerveja²⁸.

A degradação oxidativa dos ácidos amargos do lúpulo (iso- α -ácidos, α -ácidos e β -ácidos) diminui o amargor e resulta na formação de novos produtos que aumentam as notas de sabores desagradáveis²¹. A degradação de iso- α -ácidos é acelerada na presença de íons de ferro, H_2O_2 e radical hidroxilo, em que os isômeros trans são mais propensos à degradação do que os isômeros cis^{17,21}. Acetona, 2-metil-propanal, 3-metil-butan-2-ona, 4-metil-pentan-2-ona e 2-metil-3-buten-2-ol foram identificados como produtos da oxidação²⁸. Os carbonílicos de cadeia curta resultantes da oxidação das iso-humulonas (iso- α -ácidos) podem sofrer condensação aldólica para formar carbonílicos de cadeia longa mais ativos de sabores desagradáveis²¹.

2.5. Métodos para a redução da oxidação da cerveja

O oxigénio é o principal fator que influencia a vida útil da cerveja devido às suas numerosas reações de oxidação. Consequentemente, a presença de oxigénio na cerveja durante o processamento e o armazenamento devem ser evitados³⁶.

A exposição da cerveja com o ar é o principal fator que influencia a presença de oxigénio e pode ocorrer devido a vários fatores. Os fatores mais importantes são os vedantes da bomba, válvulas ou centrífugas, ar residual na tubagem, auxiliares da filtração (terras diatomáceas, sistema de dosagem das terras, filtros de cartucho, etc) e a entrada de ar nas cubas, garrafas e barris de cerveja acabada. Desta forma, é importante manter um controlo permanente nas diferentes etapas do processo cervejeiro, para poder controlar os níveis de oxigénio³⁷.

Um dos problemas causados pelo oxigénio é a oxidação de ácidos gordos insaturados, quer por oxidação enzimática quer pela presença de oxigénio. Uma solução para a redução da oxidação enzimática é o uso de cevada com baixo ou nulo teor em enzimas LOX. Foi inclusive criada um tipo de cevada sem esta enzima, denominada *PolarStar*²⁷. Para além disso, uma redução do pH da mistura de 5,4 para 5,1 pode levar à redução da atividade da LOX. O uso de compostos fenólicos tem vindo também a ser proposto para inibir a atividade desta enzima²⁸. Em relação à auto-oxidação de ácidos gordos, o método mais eficaz será a diminuição da concentração de oxigénio presente na cerveja, para diminuir a possibilidade da ocorrência destas reações²⁸.

Para limitar as transformações oxidativas na fervura do mosto, esta não deve ser muito extensa, no entanto deve ser eficiente o suficiente para remover os compostos voláteis indesejados³⁶.

A aeração do mosto é essencial para um processo de fermentação eficiente³⁶. No entanto, pode causar a deterioração da cerveja por formação de compostos desagradáveis⁵. A aeração do mosto deve ser realizada no mosto frio, para evitar a reação do oxigénio com os compostos do mosto⁵. Mesmo realizando a aeração no mosto frio é preciso ter em atenção à concentração de oxigénio injetado, o oxigénio em excesso pode ser prejudicial²⁹. Desta forma, é importante calcular qual a concentração mais adequada a injetar de oxigénio, que normalmente é entre 8 a 10 ppm, para evitar reações de oxidação¹³.

No final da fermentação, é de grande importância evitar qualquer contacto com o oxigénio. No engarrafamento, o uso de caricas impede a entrada de oxigénio durante o armazenamento e é importante remover o máximo possível do oxigénio no espaço livre da garrafa, para minimizar as reações de oxidação que podem ocorrer durante o envelhecimento³⁶. A concentração de oxigénio dissolvido na cerveja final não deve exceder os 50 ppb, pelo que quanto menor for a concentração de oxigénio dissolvido na cerveja final melhor³².

O uso de compostos antioxidantes é uma solução já usada por algumas cervejeiras, e pode ser uma solução para diminuir as reações de oxidação durante o envelhecimento. Os antioxidantes vão reagir com o oxigénio, oxidando-se. Isso faz com que haja uma menor disponibilidade de oxigénio para outras reações de oxidação prejudiciais. O ácido ascórbico (vitamina C), vitamina E, α -tocoferol, melanoidinas, compostos fenólicos e glutathione são exemplos de compostos antioxidantes usados¹³.

Outro parâmetro importante para reduzir a oxidação é a temperatura. As reações de oxidação, como todas as reações químicas, aumentam de velocidade com o aumento da temperatura. Desta forma, as temperaturas altas durante o processamento, envelhecimento e armazenamento da cerveja podem aumentar as reações de oxidação, sendo importante um controlo da temperatura. As temperaturas não devem ser muito elevadas durante o armazenamento e distribuição e as mudanças radicais de temperatura devem ser evitadas¹².

3. *Materiais e métodos*

3.1. **Medição do oxigénio dissolvido na cerveja**

O *Orbisphere* 3100 da marca HACH (figura 7) foi o equipamento portátil utilizado para medir o oxigénio dissolvido na cerveja durante todo o processo cervejeiro. Este equipamento consiste numa tecnologia Luminescente de Oxigénio Dissolvido® (LDO®), permitindo obter medições precisas de oxigénio dissolvido em bebidas.



Figura 7 - *Orbisphere* 3100 da marca HACH.

Os instrumentos que apresentam a tecnologia LDO® estão equipados com um LED de medição que irradia um pulso de luz azul, um foto-díodo como detetor de luz e um ponto revestido luminescente sensível que é exposto à amostra (figura 8). O LED de medição ao emitir o pulso de luz azul vai irradiar a parte traseira do ponto sensível ao oxigénio. O material de revestimento ao reagir à luminescência emite um pulso de luz vermelha. A intensidade e o atraso de tempo desse pulso de luz são medidos. Quando o oxigénio está presente na amostra e entra em contacto com o revestimento, a intensidade e o atraso de tempo da emissão da luz luminescente são alterados. Desta forma, quanto mais moléculas de oxigénio entrarem em contacto com o revestimento, menor a intensidade e menor a duração da radiação vermelha³⁸.

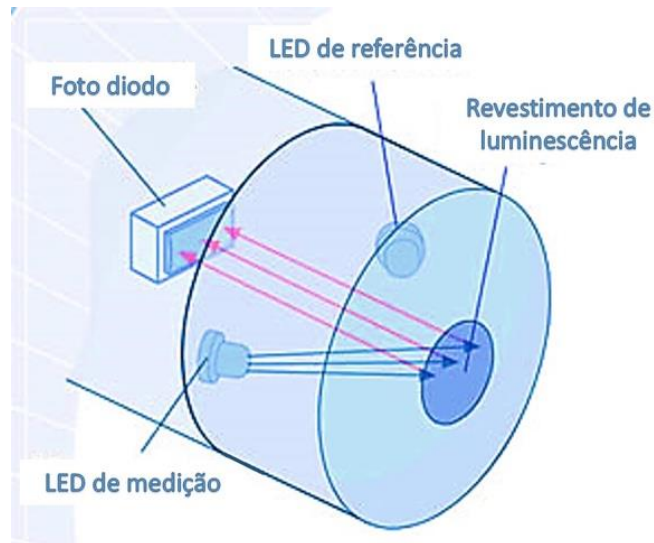


Figura 8 – Esquema da tecnologia LDO^{®38}.

O *Orbisphere* 3100 vem equipado com 2 tubos feitos de *nylon*, que permitem uma medição sem fugas. Um desses tubos faz a ligação entre a cuba e o aparelho, o outro permite o descarte da amostra do aparelho depois de ser analisada. Como podemos ver na figura 9, um tubo vai estar ligado à entrada 1 (entrada da amostra), onde a amostra vai entrar. O outro tubo vai estar ligado à entrada 2 (saída da amostra), onde a amostra é descartada.

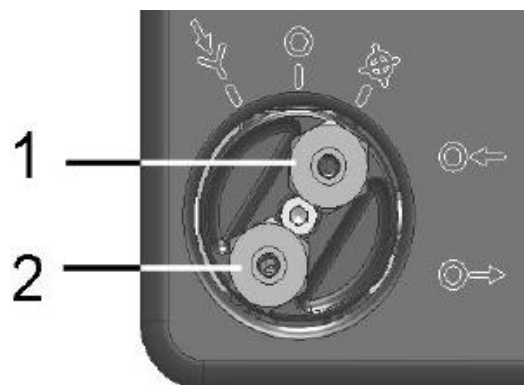


Figura 9- 1- entrada da amostra, 2- saída da amostra.

O tubo que está ligado à entrada 1 está também ligado a um adaptador (figura 10) que permite a ligação à cuba.

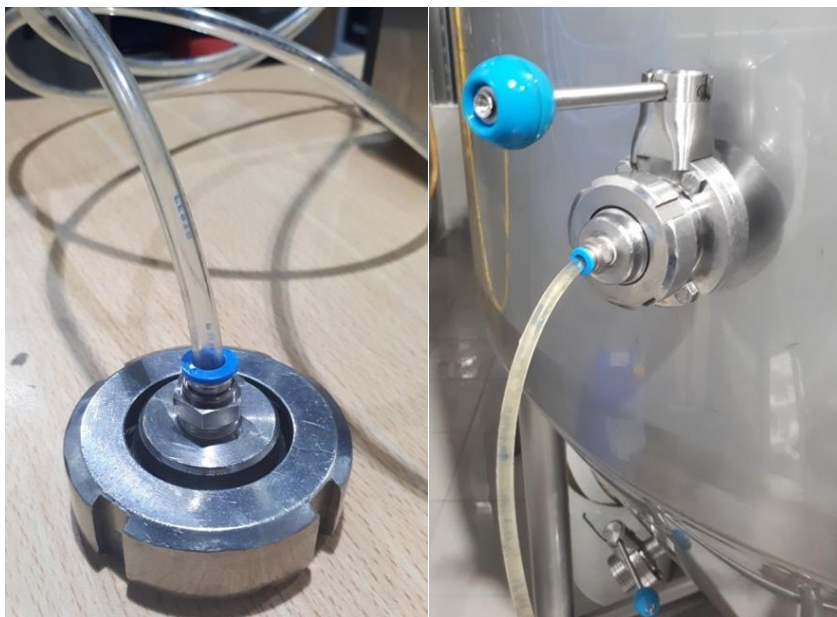


Figura 10 - Adaptador que faz a ligação entre o tubo de *nylon* e a cuba.

Após ligar o aparelho *Orbisphere* 3100 à cuba procede-se à medição do oxigénio dissolvido na cerveja armazenada na respetiva cuba. A linha de montagem pode ser observada na figura 11.



Figura 11 - Linha de montagem do *Orbisphere* 3100 à cuba.

3.2. Medição do oxigénio durante o processo de fabricação da cerveja

A medição do oxigénio dissolvido foi realizada nas seguintes cervejas: Rubi 1 (lote B143SL), Rubi 2 (lote B144SL), Rubi 3 (lote B145SL), Loira 1 (lote C001LL), Loira 2 (lote C008LL), Trigo 1 (lote C012TB), Nautika 1 (lote B148BP), Extra 1 (lote B146EX), Thartaruga 1 (lote B137IPA) e na cerveja Brut IPA 1 (Lote B131BI) produzidas na cervejaria Vadia. Essas medições foram realizadas nas seguintes etapas de produção: fermentação, maturação, filtração e carbonatação. No entanto, o protocolo de medição foi adaptado a cada tipo de cerveja e às condições que a cerveja em análise foi sujeita. No caso das cervejas Thartaruga 1 e Brut IPA 1, que são ricas em lúpulo, são submetidas ao processo de *dry-hopping*. Portanto, nestas duas cervejas foram realizadas medições do OD antes e depois deste processo. Na cerveja Loira 2, que foi submetida a uma diluição com água, o oxigénio dissolvido foi medido apenas antes e depois dessa diluição.

3.2.1. Fermentação

A fermentação é o processo onde ocorre a transformação do mosto em cerveja. Para dar início à fermentação o mosto é transferido para uma cuba de fermentação, onde se inocula as leveduras. Na cervejaria Vadia, as leveduras utilizadas são as *Saccharomyces pastorianus*, para a produção de cervejas Lager, a *S.cerevisiae var. diastaticus* para a produção da cerveja Trigo e as cervejas *India Pale Ale* (IPA) e *American Pale Ale* (APA) são produzidas com leveduras *S.cerevisiae*. Estas leveduras podem ser de pacote ou então recuperadas de outras fermentações. A levedura é recuperada no final da maturação e armazenada em recipientes próprios e a baixas temperaturas até o dia de uma nova produção. No dia de produção, procede-se à análise da viabilidade da levedura, e se esta for superior a 70% (valor estipulado pela empresa), a levedura é utilizada. A determinação da viabilidade é efetuada através de um microscópio ótico, uma câmara de contagem de *Neubauer* e corante azul-de-metileno 1.5%, que nos permite contabilizar o número de células mortas (azuis) e células vivas (incolores) e obter a percentagem de viabilidade celular. Esta viabilidade é calculada através da seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas contabilizadas}}{n^{\circ} \text{ de células totais (c. vivas + c. mortas)}} \times 100$$

Se a levedura apresentar uma má viabilidade, esta é descartada e recorre-se ao uso de uma levedura comercial.

A empresa, nesta etapa, procede também à realização da aeração do mosto. A oxigenação é realizada no mosto frio para evitar a oxidação deste. A injeção de oxigénio é efetuada logo após a inoculação das leveduras e a injeção de oxigénio ao mosto é realizada durante, sensivelmente, 5 min. A empresa não quantifica a quantidade de oxigénio injetado.

Com o intuito de calcular a taxa de fermentação das cervejas produzidas e perceber em que fase da fermentação a cerveja se encontra, a empresa efetua análises físico-químicas desde o dia da inoculação das leveduras até ao final da fermentação. As análises físico-químicas realizadas na empresa são a análise do pH, o teor de sólidos solúveis totais (em °Brix), que nos permite estimar a quantidade de açúcares ainda presentes, o potencial alcoólico e ainda a percentagem de atenuação do mosto, que mostra a percentagem de extrato de mosto que foi fermentado.

A determinação do pH é realizada por potenciometria, através de um eletrodo de pH digital com sensor de temperatura incorporado. Para a realização da medição, o eletrodo é submerso na amostra e a leitura é registada quando o valor estabiliza. O valor é registado após realizar 2 medições consecutivas e os valores terem coincidido.

A determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix) é realizada através da leitura direta num refratómetro digital portátil, que se baseia na medição do índice refrativo de uma solução. A amostra é colocada no refratómetro com o auxílio de uma pipeta e a leitura é realizada. O valor é registado quando permanece constante. O mesmo aparelho que determina o teor de sólidos solúveis totais, também determina o potencial alcoólico (em %vol/vol). A medição do teor de álcool no produto final é estimada com base no teor de açúcares ainda presentes no mosto e é conhecido como álcool potencial. A medição é efetuada da mesma forma que para o teor de sólidos solúveis totais, apenas se altera o parâmetro em análise no aparelho.

Com o valor do potencial alcoólico e através da equação 11, é possível calcular a percentagem de atenuação do mosto, parâmetro este que traduz a extensão da fermentação.

Equação 11- Potencial alcoólico dia 1 – P. alcoólico determinado no dia de inoculação das leveduras no mosto; P. alcoólico dia x- P. alcoólico determinado no dia x após inoculação das leveduras no mosto; P. alcoólico limite – P. alcoólico mais baixo que se poderá conseguir obter para aquele tipo de cerveja.

$$\text{Atenuação (\%)} = \frac{\text{Potencial alcoólico dia 1} - \text{P. alcoólico dia x}}{\text{P. alcoólico dia 1} - \text{P. alcoólico limite}} \times 100$$

Com a realização destas análises físico-químicas a empresa consegue acompanhar a taxa de fermentação, e perceber em que fase a cerveja se encontra.

A medição do oxigénio nesta fase foi realizado nas cervejas Rubi 1, 2 e 3, Trigo 1, Nautika 1 e Extra 1. A fermentação é uma fase onde ocorre o consumo de oxigénio e o registo do valor de oxigénio dissolvido apesar de ser útil, pode não corresponder ao valor final, pois este ainda pode estar a ser utilizado pelas leveduras.

3.2.2. Maturação

A maturação corresponde à última fase da fermentação (fase secundária) e tem como principal objetivo eliminar ou, pelo menos, reduzir o teor de compostos indesejáveis presentes no mosto fermentado, sendo alguns dos mais importantes o diacetilo e o acetaldeído². A maturação pode durar uma a várias semanas, tudo depende das condições que este processo é realizado.

Na empresa, a duração desta etapa depende da necessidade e do tempo em que se precisa da cerveja pronta. São realizadas provas sensoriais, para perceber se a cerveja está maturada o suficiente e se estiver sensorialmente pronta avança-se para a próxima etapa. No entanto, mesmo que a cerveja já esteja maturada o suficiente, ela pode permanecer mais tempo na cuba de fermentação. Esta fase dura entre 1 a 3 semanas, após este tempo é aconselhado avançar no processo cervejeiro, pois sabores indesejáveis podem surgir.

Esta etapa não sofre grandes riscos de contaminação pelo oxigénio, pelo que os seus valores não tendem a distanciar-se muito dos valores registados no final da fermentação. As cervejas analisadas nesta etapa foram a Rubi 1, 2 e 3, Trigo 1, Nautika 1, Extra 1, Loira 1 e Thartaruga 1. Nesta última foram realizadas duas medições, no início da maturação e 3 dias depois de a maturação começar.

3.2.3. *Dry-hopping*

O *dry-hopping* é a adição de lúpulo nos vasos de fermentação, maturação, ou em barris, com o objetivo de ocorrer a dissolução de compostos que conferem aroma à cerveja.

Na empresa o *dry-hopping* foi realizado em dois estilos de cerveja, na *India Pale Ale (IPA)* e na *Brut IPA*. O sistema de *dry-hopping* (figura 12) é constituído por uma coluna de recirculação e uma bomba que se ligam à cuba na qual a cerveja se encontra a maturar.



Figura 12 - Sistema de *dry-hopping* na empresa.

Para dar início a este processo coloca-se a quantidade de lúpulo (em *pellets*) necessária, que foi colocado previamente em sacos porosos. Liga-se a cuba de maturação à coluna de recirculação, onde a entrada da cerveja acontece pela parte inferior, enquanto a saída sucede pela parte superior da coluna. Este sentido tem a finalidade de aumentar o tempo que a cerveja permanece, dentro do equipamento, em contacto com o lúpulo. Quando a coluna se encontra cheia, realiza-se a ligação da coluna à bomba, e desta à cuba de maturação. Esta montagem vai permitir a recirculação da cerveja para que o *dry-hopping* aconteça em toda a cerveja de forma uniforme. Este processo demora, normalmente, 4 a 5 horas. A sua duração depende sempre da intensidade de sabor pretendido.

Com o intuito de perceber se este processo tem alguma influência na oxidação da cerveja, realizou-se medição do oxigénio dissolvido antes e depois do *dry-hopping* na

cerveja Thartaruga 1 e Brut IPA 1. Assim será possível concluir se o lúpulo, ou o processo, contribui para o aumento da quantidade de oxigénio dissolvido na cerveja.

3.2.4. Filtração

Na empresa Essência d'Alma, Lda, a filtração dos produtos era realizada exclusivamente através de filtros de cartuchos. No entanto, recentemente outro tipo de filtração foi testada e posteriormente implementada. Em 2019, começou-se a filtrar alguns lotes recorrendo a filtros de terras diatomáceas. Desta forma, existem dois tipos de filtração usados na empresa, filtração por cartuchos e filtração por terras diatomáceas.

A filtração por cartuchos necessita de uma cuba vazia e desinfetada para onde o produto filtrado é transferido. Deve também existir uma diferença de pressões entre a cuba com a cerveja a filtrar e a cuba vazia, para que seja possível o fluxo de uma cuba para a outra. Existe a ligação da cuba onde o produto está armazenado (cuba de saída) com a cuba vazia (cuba de receção). Entre essa ligação coloca-se, no início, um filtro com malha de maior dimensão (5 μm) e no final um filtro com malha de dimensão menor (1 μm). A válvula da cuba de saída (ligada ao primeiro filtro) e a válvula da cuba de receção (ligada ao segundo filtro) são abertas lentamente, para controlo do fluxo da cerveja durante a filtração. Durante este processo, o escape de gases da cuba de receção permanece aberto e a cuba de saída recebe uma mistura de CO_2 e N_2 para garantir a diferença de pressões entre as cubas. Quando a cerveja passa na totalidade para a cuba de receção, as cubas são fechadas e a linha de montagem é desmontada e os filtros devidamente lavados, para uma próxima utilização.

A filtração por terras diatomáceas é um processo mais demorado e trabalhoso, no entanto a sua eficácia é maior. Antes de se iniciar o processo, é necessário ter disponível, tal como na filtração por cartuchos, uma cuba vazia e higienizada, onde é armazenada a cerveja filtrada. Nesta filtração são utilizados 3 tipos de terras: terras finas (Celatom[®]FP4), médias (Celatom[®]FW12) e grossas (Celatom[®]FW50), que são utilizadas para formar as camadas de filtro. A água também é um requisito nesta filtração, a empresa utiliza água aerada, a mesma que é usada durante a produção da cerveja. O filtro de terra é constituído por um recipiente de filtro (onde estão as velas de filtro), uma unidade de dosagem (onde se adicionam as terras diatomáceas), um tubo de entrada da cerveja não filtrada ou da água, 3 bombas, um tubo de

saída da água ou da cerveja filtrada, 2 zonas de remoção de ar (da tampa e do filtro), 1 zona de remoção dos sedimentos. Antes de se iniciar a filtração enche-se o filtro com água desgaseificada, pelo tubo de entrada. O líquido é circulado e adicionam-se as terras (finas, médias e grossas) na unidade de dosagem, para formar as pré-camadas (1º e 2º pré-camadas) que vão constituir a camada porosa filtrante. Para cada camada o líquido é circulado por 10 a 15 min. A filtração inicia-se quando se substituí a entrada de água por cerveja. Liga-se a cuba de saída ao tubo de entrada do filtro e assim a cerveja começa a circular no filtro e a água vai saindo pelo tubo de saída. É nesta fase que se adicionam as terras finas e médias para formar uma camada contínua, ao mesmo tempo que ocorre a filtração e a camada porosa filtrante é renovada na vela de filtro. Para finalizar o processo, substitui-se a entrada de cerveja por água desgaseificada, retira-se os resíduos das terras, faz-se uma retrolavagem suportada por picos de pressão e no fim esteriliza-se o filtro com água quente. A duração deste processo depende do tipo de cerveja, da turbidez que esta apresenta e a quantidade de cerveja que está a ser filtrada.

Para verificar o sucesso da filtração, recorreu-se à medição da turbidez das cervejas antes e depois deste processo. Esta medição foi realizada através de um turbidímetro, que indica a concentração de partículas em suspensão na amostra. Os valores são obtidos em unidades FTU (unidades de formazinha de turbidez), estando estes relacionados com as unidades EBC (do inglês *European Brewery Convention*) onde $1 \text{ FTU} = 0,25 \text{ EBC}$.

Com o intuito de controlar a oxidação durante esta etapa, e perceber onde pode ocorrer a contaminação, foram realizadas medições do oxigénio dissolvido. A medição do oxigénio dissolvido foram realizadas antes do processo se iniciar e no final. A medição no final da filtração era realizado de imediato, na cuba de receção. As cervejas analisadas foram as cervejas Nautika 1, Rubi 2 e Extra 1, sujeitas à filtração por cartuchos e as Brut IPA 1 e Thartaruga 1, sujeitas à filtração por terras diatomáceas.

3.2.5. Carbonatação

Na empresa todas as bebidas são carbonatadas, exclusivamente, com CO₂ inerte. Esta etapa começa pela injeção de CO₂ diretamente na cuba onde está armazenada a bebida a

baixas temperaturas (1-3°C), até atingir 1 bar de pressão. Quando esse valor é atingido procede-se à montagem do sistema de carbonatação (figura 13).



Figura 13 - Sistema de carbonatação na empresa.

O processo inicia-se pela abertura da cuba onde a bebida sai por gravidade e entra numa bomba que projeta a cerveja de volta para a cuba. Durante este ciclo há uma injeção de CO₂ no produto à saída da bomba. Este processo normalmente dura entre 4 a 5 horas e a pressão atingida é cerca de 1,5 bar. São realizadas provas sensoriais para perceber se o nível de carbonatação está adequado aos valores pretendidos. Quando a concentração de dióxido de carbono na cerveja está adequada fecha-se a cuba, desliga-se a bomba e desmonta-se a linha de montagem.

A carbonatação também é uma etapa em que pode ocorrer a contaminação por oxigénio, e é importante perceber até que ponto isso acontece. Desta forma, realizou-se a medição do oxigénio dissolvido antes e após a carbonatação nas cervejas Nautika 1, Trigo 1, Brut IPA 1, Extra 1, Thartaruga 1 e na mistura das cervejas Rubi (1, 2 e 3).

4. Resultados e discussão

4.1. Caracterização das cervejas analisadas

As cervejas produzidas são analisadas ao longo da fermentação, através da determinação do teor de sólidos solúveis totais (°Brix), potencial alcoólico (%vol/vol), pH, temperatura (°C) e determinação da percentagem de atenuação do mosto. Essas análises são efetuadas diariamente desde a inoculação de leveduras até ao último dia de fermentação.

Na tabela 4 podemos observar os resultados das análises correspondentes ao dia em que a medição do oxigénio dissolvido foi efetuado nas cervejas Rubi 1, 2 e 3, Nautika 1, Trigo 1 e Extra 1, durante a fermentação. Nas cervejas Rubi 1,2, Nautika 1 e Extra 1 os valores de atenuação são inferiores em relação às restantes cervejas (Rubi 3 e Trigo 1) porque a medição foi realizada durante a fermentação, enquanto nas restantes cervejas os valores correspondem ao último dia da fermentação. Na cerveja Rubi 1 o valor foi registado no 4º dia de fermentação, na Rubi 2 no 3º, na Nautika 1 no 6º dia e na Extra 1 no 7º de fermentação. Nas cervejas Rubi 1, 2 e 3, Nautika 1 e Extra 1, recorreu-se à utilização de leveduras recuperadas. A percentagem de viabilidade das respetivas leveduras utilizadas em cada cerveja foi calculada, apresentando uma boa viabilidade (superior a 70%), isso permite um bom desempenho da levedura durante a fermentação (tabela 4). No caso da cerveja Trigo 1, recorreu-se ao uso de leveduras comerciais não recuperadas.

Tabela 4 - Análises físico-químicas das cervejas Rubi 1, 2 e 3, Nautika 1, Trigo 1 e Extra 1 e viabilidade das leveduras utilizadas nas respetivas cervejas.

	Rubi 1	Rubi 2	Rubi 3	Nautika 1	Trigo 1	Extra 1
°Brix	12,7	13,3	8,9	13,3	6,7	11,4
% vol/vol	7	7,3	4,9	7,3	3,7	6,3
pH	4,65	4,76	4,57	4,61	4,16	4,57
Temperatura (°C)	11,9	11,8	12,0	12,2	21,2	11,9
Atenuação (%)	23,91	19,15	70,83	52,25	75,67	59,38
Viabilidade celular (%)	82,33	77,27	75,70	78,70	_____	79,61
Dia de análise	4º dia	3º dia	Último dia	6º dia	Último dia	7º dia

Na tabela 5, podemos observar os valores das análises realizadas no último dia da fermentação, visto que é o dia mais próximo da primeira medição de oxigénio dissolvido

realizada nas cervejas Brut IPA 1, Loira 1 e Thartaruga 1, pois o OD não foi medido durante a fermentação. Na Brut IPA 1 a primeira medição foi antes da filtração e nas restantes foi durante a maturação.

Tabela 5 - Análises físico-químicas das cervejas Brut IPA 1, Loira 1 e Thartaruga 1 no último dia de fermentação.

	Brut IPA 1	Loira 1	Thartaruga 1
°Brix	4,3	6,6	8,2
% vol/vol	2,3	3,7	4,5
pH	4,10	4,26	4,39
Temperatura (°C)	17,5	14,5	19,2
Atenuação (%)	—	83,78	66,67

As cervejas Rubi 3 e Trigo 1 da tabela 4 e as cervejas da tabela 5 apresentam um teor de sólidos solúveis totais, pH e um potencial alcoólico menor que as restantes cervejas. Isso está relacionado com o dia em que a análise foi efetuada. Nestas cervejas os dados da análise correspondem ao final da fermentação. E conforme a fermentação prossegue o teor de sólidos solúveis, o potencial alcoólico e o pH tendem a diminuir. O teor de sólidos solúveis diminui porque os açúcares do mosto estão a ser convertidos noutros produtos, ao longo da fermentação. A diminuição do pH está relacionada com o aumento de CO₂ que é produzido ao longo da fermentação. Por fim, com o aumento da produção de etanol e por consequente a diminuição de açúcares presentes, o potencial alcoólico também diminui. O mesmo não se verifica com a percentagem de atenuação do mosto, que tende a aumentar com o final da fermentação. Este parâmetro traduz a extensão da fermentação, ou seja, permite perceber qual a percentagem de açúcar presentes no mosto que foram fermentados. Com o decorrer da fermentação, há uma maior percentagem de açúcar presentes no mosto que foram fermentados, ou seja há uma maior percentagem de atenuação do mosto.

4.2. Determinação do oxigénio dissolvido ao longo do processo cervejeiro

O oxigénio dissolvido (OD) foi medido em cervejas *German Pilsner* (Loira), *Märzen* (Rubi), Trigo, *Baltic Porter* (Nautika), *Doppelbock* (Extra), *Thartaruga* (IPA) e *Brut IPA*.

Os resultados foram seccionados pelas etapas de produção em que a medição foi realizada, nomeadamente fermentação, maturação, *dry-hopping*, filtração e carbonatação.

A realização destas medições teve como objetivo a análise do comportamento do oxigénio ao longo do processo cervejeiro. Essa análise permite a perceção dos métodos a implementar para a mitigação do oxigénio dissolvidos nas cervejas.

4.2.1. Fermentação e/ou maturação

Na figura 14 podemos observar os valores do oxigénio dissolvido na fermentação, após a fermentação e na maturação das cervejas Rubi 1 e 2. São também apresentados os valores de OD na fermentação e maturação das cervejas Rubi 3, Trigo 1, Nautika 1 e Extra 1. Na cerveja Loira 1 a medição só foi realizada durante a maturação. Na Thartaruga 1 o oxigénio foi medido duas vezes na maturação, com 3 dias de diferença, permitindo observar o comportamento do OD durante a maturação.

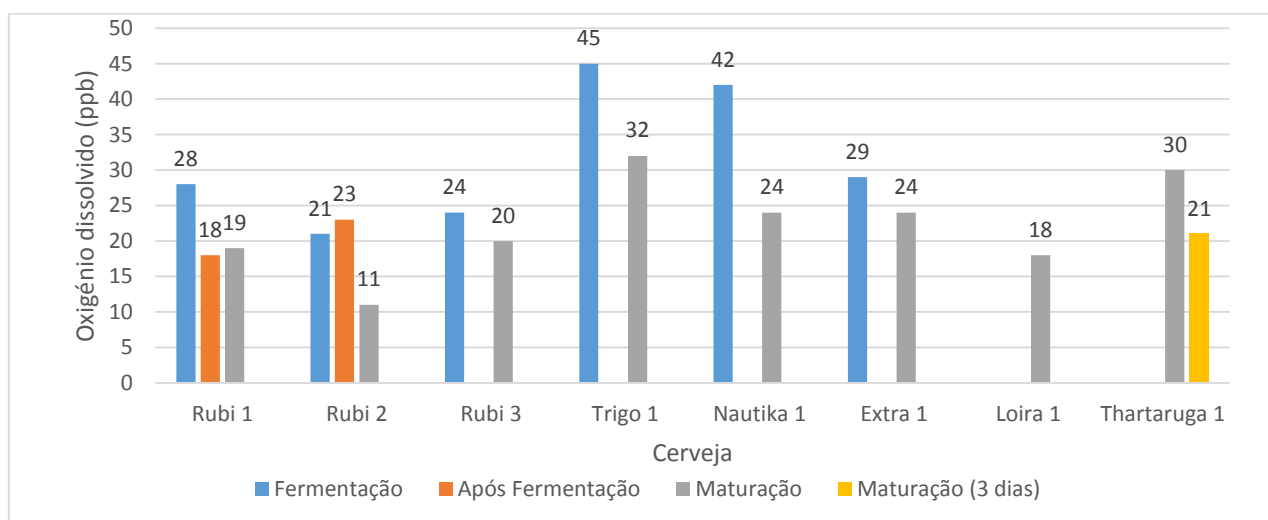


Figura 14- Oxigénio dissolvido nas cervejas Rubi 1,2 e 3, Trigo 1, Nautika 1, Extra 1, Loira 1 e Thartaruga 1 na fermentação e maturação.

Nos resultados apresentados podemos verificar que em todas as cervejas, tanto na fermentação como na maturação, o OD é sempre superior a 10 ppb, estando entre os 11 a 45 ppb. Se calcularmos a média do OD nas duas etapas verificamos que esta tem um valor de, aproximadamente, 25 ppb. Maioria das medições foram realizadas durante a fermentação, o que significa que o oxigénio ainda estava a ser utilizado, sendo que a percentagem de OD

tende a diminuir até ao final da fermentação. Na Rubi 1 (figura 14) podemos verificar uma diminuição de cerca de 36%. Também podemos averiguar que, em todas as cervejas, os valores de OD na maturação são inferiores aos valores registados na fermentação. As diminuições verificadas entre a fermentação e maturação variam entre os 17% até os 83%, sendo o valor médio de 45%. Estas diminuições significam que o oxigénio na fermentação ainda estava a ser utilizado, pelas leveduras, e que o teor de oxigénio nesta etapa tende a diminuir. No final da fermentação e na maturação já não existe consumo de oxigénio por parte das leveduras. Assim, o oxigénio que se encontra no final da fermentação e na maturação é prejudicial.

A fermentação é um processo que requer oxigénio para a levedura se reproduzir eficientemente²³. A presença de oxigénio nesta etapa não é prejudicial sendo mesmo necessário, desta forma, a empresa realiza a aeração do mosto para fornecer oxigénio suficiente à levedura. Os valores apresentados, apesar de superiores aos valores recomendados, podem não ser prejudiciais para a qualidade final da cerveja. No final da fermentação e maturação os valores de oxigénio dissolvido devem ser quase nulos. Nestas duas etapas o valor de referência é inferior a 10 ppb³⁹ e valores superiores são prejudiciais para a qualidade final da cerveja. Apesar dos valores médios de OD no final da fermentação e maturação (25 ppb) não serem muito superiores ao valor de referência, é importante mantê-lo o mais baixo possível.

Os valores registados acima do valor de referência podem ser justificados pela realização da aeração do mosto, que é realizada na empresa. Este processo é necessária para uma boa viabilidade e desempenho das leveduras, e uma fermentação rápida e eficiente¹³. Apesar da adição de oxigénio ser essencial, é crucial saber a quantidade que é necessária adicionar. A falta de oxigénio origina fermentações paradas, longos períodos de fermentação, cervejas sub-atenuadas, *stress* de leveduras e sabores desagradáveis. Muito oxigénio raramente é prejudicial. No entanto, adicionar mais oxigénio para gerar mais crescimento das leveduras, pode levar a um crescimento excessivo, que invulgarmente é ideal para o sabor da cerveja. Apesar da maioria das linhagens de leveduras conseguir lidar com altos níveis de oxigénio dissolvido, é possível fornecer tanto ao ponto de se tornar prejudicial. O uso excessivo de oxigénio puro, na aeração, pode resultar em altos níveis de álcoois fusel, aumento de acetaldeído e outros problemas de sabor. É importante encontrar um equilíbrio e perceber qual o valor de oxigénio que se deve injetar. O valor indicado é de

8 a 10 ppm, mas também é preciso ter em atenção as condições do mosto e a quantidade e qualidade das leveduras inoculadas^{2,13}. Para um melhor controlo dos níveis de oxigénio dissolvido no final da fermentação e maturação, a empresa deve adicionar uma quantidade controlada de oxigénio. A quantidade de oxigénio que a empresa injeta não está definida, recorrendo apenas a um controlo por tempo, uma vez que a adição de oxigénio é efetuada durante, sensivelmente, 5 min. Este método não é eficaz num controlo preciso da quantidade de oxigénio adicionada ao mosto. A implementação de um método em que possibilite a injeção de um valor controlado de oxigénio é aconselhado, para assim evitar a ausência ou excesso de oxigénio no mosto.

Para além do controlo da quantidade de oxigénio adicionado ao mosto, a altura em que se realiza a aeração também é importante. A aeração do mosto, para que não provoque a sua oxidação, deve ser realizado no mosto arrefecido⁵. A empresa deve continuar a realizar a aeração no mosto frio, para evitar a oxidação deste.

Através da análise destes resultados conseguimos perceber que a quantidade de oxigénio que é injetado deve ser controlada eficazmente, definindo uma quantidade de 8 a 10 ppm de O₂. Deve ser realizado um controlo do oxigénio dissolvido nestas duas etapas, para tentar minimizar os valores de OD, e mantê-los inferiores a 10 ppb.

4.2.2. *Dry-hopping*

O *dry-hopping* é uma etapa exclusiva da cerveja IPA e Brut IPA, realizada para enriquecer o aroma a lúpulo na cerveja. Com o intuito de perceber se esta etapa tem algum efeito no oxigénio dissolvido na cerveja, realizou-se a medição antes e depois do *dry-hopping*, nas cervejas Thartaruga 1 e Brut IPA 1. Na cerveja Thartaruga 1 (figura 15), uma cerveja IPA, foram realizadas duas medições com 12 dias de diferença, antes e após a realização do *dry-hopping*. A cerveja Brut IPA 1 foi sujeita a três *dry-hopping*. Um foi realizado na forma convencional, durante a maturação dentro da coluna de recirculação, o segundo foi também na maturação, no entanto o lúpulo foi adicionada dentro da cuba. O último foi realizado após a filtração por terras diatomáceas dentro do filtro. A medição do OD na Brut IPA 1 (figura 16) foi realizada, antes e depois, do último *dry-hopping*, realizado 3 meses após a sua filtração.

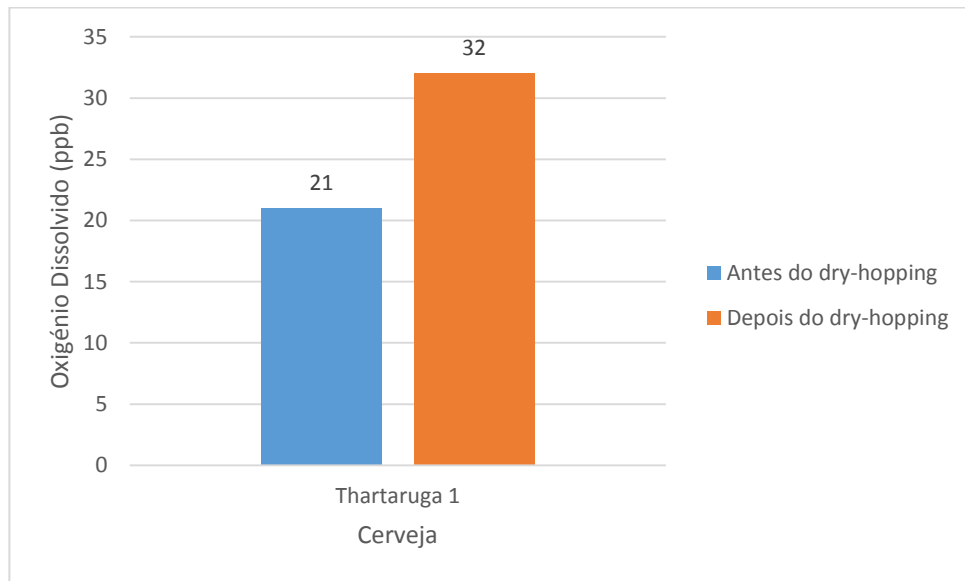


Figura 15- Oxigênio dissolvido na cerveja Thartaruga 1 antes e depois do *dry-hopping*.

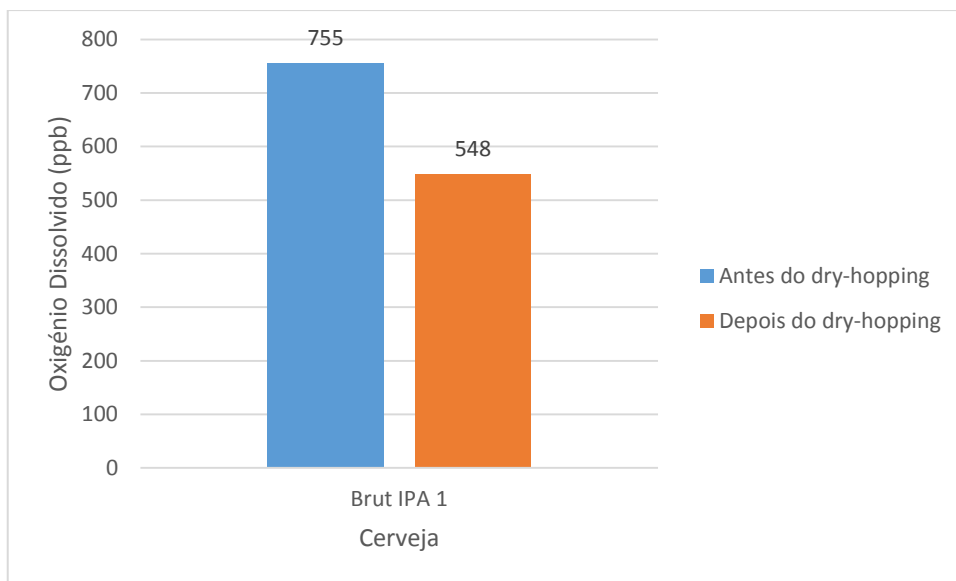


Figura 16- Oxigênio dissolvido na cerveja Brut IPA 1 antes e depois do segundo *dry-hopping*.

Como o *dry-hopping* foi realizado em alturas diferentes nas duas cervejas (Thartaruga 1 e Brut IPA 1), os valores não podem ser correlacionados, pelo facto de não haver qualquer semelhança entre eles. Os valores, entre as duas cervejas, apresentam uma grande discrepância porque o *dry-hopping* realizado na Thartaruga 1 foi durante a maturação e o realizado na Brut IPA 1 foi 3 meses depois da filtração por terras diatomáceas e neste intervalo a cerveja foi transferida para barris de 50 L e barricas e no dia do *dry-hopping*

voltou a ser armazenada em cuba. Isso significa que, a cerveja Brut IPA 1, esteve mais sujeita à exposição do oxigénio que a Thartaruga 1, quando estas medições foram realizadas.

Na figura 15 o OD aumentou cerca de 52% após a adição do lúpulo. Isso pode ter sido provocado pelo processo de *dry-hopping*. Em todos os processos que há a montagem de um sistema, há a possibilidade de ocorrer entradas de ar, através de fugas, tubos mal encaixados, abertura e fecho sucessivo de cubas e, neste caso em específico, o mau isolamento da coluna de recirculação³⁷. Isso pode ser a explicação para este aumento de OD após a realização desta etapa. Na figura 16 verificamos uma evolução do OD completamente diferente, houve uma diminuição de 27,4%. Este fenómeno não significa que o oxigénio desapareceu, mas pode ter sido consumido nas várias reações de oxidação. Apesar do oxigénio no seu estado fundamental não ser particularmente reativo, a sua conversão em espécies reativas de oxigénio pode ter um impacto significativo na instabilidade do sabor da cerveja. Essa conversão pode ser catalisada por iões de ferro, que podem ser introduzidos em quantidades significativas por *dry-hopping*³². Como na cerveja Brut IPA 1 havia uma elevada presença de OD (755 ppb), a realização do *dry-hopping*, com uma duração de 4/5 horas, pode ter provocado uma maior disponibilidade de iões de ferro e aumentar a probabilidade do oxigénio reagir com esses iões e originar ROS.

De uma forma geral é importante referir o impacto da realização do *dry-hopping* com a presença de OD na estabilidade de sabor e aroma a longo prazo. O lúpulo fornece e protege aromas e sabores positivos na cerveja, o mesmo não se verifica com o *dry-hopping*. Este processo representa um grande desafio para os fabricantes de cerveja, porque há um maior potencial para o OD entrar no fluxo durante o processamento. O oxigénio dissolvido é certamente relevante para a degradação oxidativa dos iso- α -ácidos e oxidação lipídica que contribuem para a formação de aromas fortes. Nas cervejas em que foi realizado o *dry-hopping* e apresentam um elevado conteúdo em OD, existe um aumento de névoa, neblina, cor e uma diminuição dos níveis de amargura durante o envelhecimento^{32,40}. Assim é importante que o OD antes da realização do *dry-hopping* seja o mais baixo possível, para evitar as reações oxidativas entre o oxigénio e os componentes do lúpulo, como é o caso dos ácidos amargos do lúpulo.

A realização desta etapa e a montagem do sistema pode provocar pequenas entradas de ar na cerveja, que justificam o aumento da percentagem de OD após o *dry-hopping*. Deve

ser feita uma revisão, previamente, para verificar se existe alguma possível entrada de ar ou um mau isolamento e tornar a linha de montagem o mais isolada possível.

As cervejas com *dry-hopping* e valores de OD crescente tendem a apresentar uma maior probabilidade de oxidação com o envelhecimento da cerveja, e por isso devem ser evitados valores acrescidos de OD a partir da maturação de cerveja com *dry-hopping*. Se a cerveja apresentar valores elevados de OD na maturação, e se se realizar a adição de lúpulo por *dry-hopping*, a cerveja deve ser acompanhada durante o envelhecimento, através de análises sensoriais, para um maior controlo da oxidação da cerveja.

4.2.3. Filtração

A filtração é um processo que tem como principal objetivo a diminuição da turbidez na cerveja, para a tornar mais clara e estável às mudanças de temperatura¹⁶. Na empresa, a cerveja pode ser filtrada através de dois tipos diferentes de filtros, cartucho ou terras de diatomáceas, dependendo do tipo de cerveja, da turbidez desejada e do tempo. Apesar de serem filtrações diferentes, a medição de OD realizou-se da mesma forma, antes e depois da filtração. O objetivo foi perceber qual é o contributo dos diferentes tipos de filtração para a incorporação de oxigénio e, conseqüentemente para a oxidação da cerveja.

A medição do OD durante a filtração por cartuchos realizou-se nas cervejas Nautika 1, Rubi 2 e Extra 1 (figura 17). Nas cervejas Nautika 1 e Extra 1 as medições iniciais foram realizadas 9 dias antes da filtração, ainda durante a maturação da cerveja. Após a finalização da filtração mediu-se novamente o oxigénio dissolvido. Na cerveja Rubi 2 as medições antes e depois da filtração foram realizadas no mesmo dia.

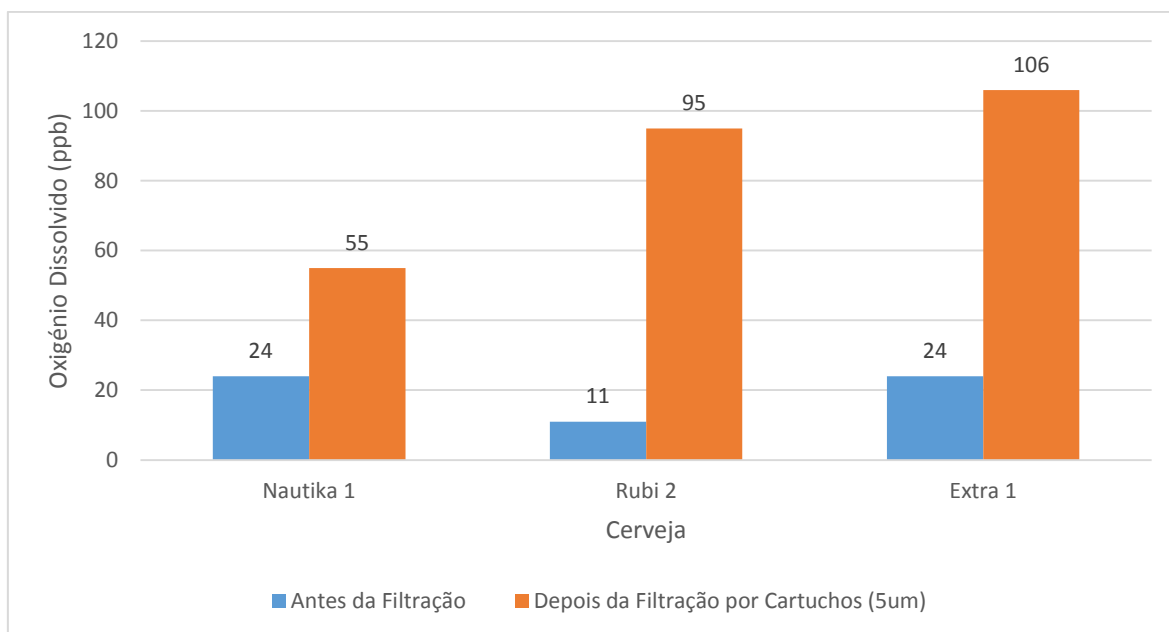


Figura 17 – Oxigênio dissolvido nas cervejas Nautika 1, Rubi 2 e Extra 1 antes e depois da filtração por cartuchos (5µm).

Nas cervejas filtradas por cartuchos (5 µm) verificou-se um aumento de oxigênio dissolvido. Na Nautika 1 a filtração adicionou à cerveja mais 31 ppb de OD, na Rubi 2 houve um aumento de 84 ppb e na Extra 1 de 82 ppb. Nesta etapa de produção os valores recomendados de oxigênio dissolvido estão entre os 10 e os 50 ppb³⁹. Na cerveja Nautika 1, apesar de o valor de OD ser de 55 ppb, pode-se considerar que está dentro do limite. O mesmo não acontece com as restantes cervejas, em que os valores registados após a filtração são o dobro do limite dos valores de referência.

Para além da medição do oxigênio dissolvido, foi também realizado a medição da turbidez (tabela 6) antes e depois das cervejas (Nautika 1, Rubi 2 e Extra 1) serem filtradas.

Tabela 6 - Turbidez inicial e final das cervejas Nautika 1, Rubi 2 e Extra 1 filtradas com filtros de cartuchos (5µm).

Cerveja filtrada	Turbidez inicial (Ftu)	Turbidez final (Ftu)
Nautika 1	379	310
Rubi 2	125	35,7
Extra 1	442	265

Como podemos verificar pelos resultados apresentados na tabela 6, a filtração por cartuchos foi eficiente na diminuição da turbidez nas três cervejas. Na cerveja Nautika 1 a filtração diminui 18% da turbidez, na Rubi 2 houve uma diminuição de 70% e na Extra 1 a

turbidez baixou 40%. Esta diminuição acontece, porque a filtração por cartuchos de 5 μm remove eficazmente as células de leveduras mortas e dormentes, concebendo um sabor mais limpo à cerveja¹⁶

Apesar de a filtração ter concedido o objetivo principal, a diminuição da turbidez da cerveja, é importante ter em atenção os valores do OD dissolvido depois da filtração. Nas três cervejas analisadas houve um grande aumento do OD para além dos valores de referência³⁹. O aumento registado foi 2 a 5 vezes superior nas 3 amostras, o que mostra que a filtração por cartuchos é uma etapa problemática para a oxidação da cerveja, aumentando o contacto do oxigénio com a bebida.

Com o propósito de comparar os dois tipos de filtração realizados na empresa, foram também realizadas medições de OD na cerveja Brut IPA 1 e na Thartaruga 1 (figura 18) que foram sujeitos à filtração por terras diatomáceas. Na cerveja Brut IPA 1 as medições foram realizadas, no mesmo dia, antes e depois da filtração. O mesmo processo foi realizado na cerveja Thartaruga 1 no entanto realizou-se uma medição extra no dia seguinte à filtração.

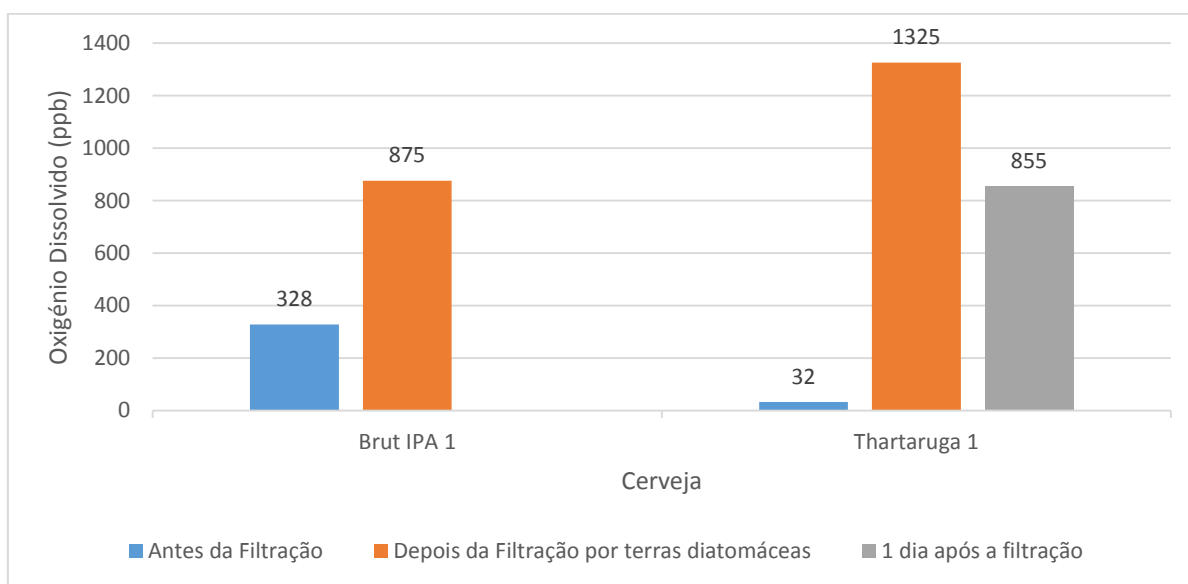


Figura 18 – Oxigénio dissolvido nas cervejas Brut IPA 1 e Thartaruga 1 antes e depois da filtração por terras diatomáceas.

Nos resultados obtidos, observamos que o oxigénio dissolvido aumentou nas duas cervejas. Na cerveja Brut IPA 1, que já apresentava valores de OD elevados, verificou-se um aumento de 547 ppb. Na cerveja Thartaruga 1 os valores de OD aumentaram drasticamente de 32 ppb para 1325 ppb, existindo um aumento de 1293 ppb. Na medição

realizada no dia seguinte à filtração da cerveja Thartaruga 1, verificamos uma diminuição de 35,5% de OD. Esta diminuição pode significar que o oxigénio presente na cerveja começou a reagir, através de reações de oxidação.

A medição da turbidez antes e depois da filtração por terras diatomáceas também foi realizada. Assim mediu-se a turbidez inicial e final (tabela 7) nas cervejas Brut IPA 1 e Thartaruga 1.

Tabela 7 - Turbidez inicial e final das cervejas Brut IPA 1 e Thartaruga 1 filtradas com filtros de terras diatomáceas.

Cerveja filtrada	Turbidez inicial (Ftu)	Turbidez final (Ftu)
Brut IPA 1	200	6,95
Thartaruga 1	169	20,6

Como podemos verificar na tabela 7, a filtração com filtros de terras diatomáceas foi muito eficiente na diminuição da turbidez da cerveja. Na cerveja Brut IPA 1 a turbidez diminui cerca de 96% e na Thartaruga 1 diminui aproximadamente 87%. Estas percentagens mostram que este tipo de filtração é mais eficiente na diminuição da turbidez do que a filtração por cartuchos (tabela 6). Esta eficiência deve-se à grande porosidade das terras diatomáceas. Esta característica juntamente com a formação específica de uma camada de terras tem a capacidade de formar um bolo de filtro em camadas de poros muito finos. Este fenómeno permite reter partículas de turbidez até um tamanho de 0.1 mm. O resultado é uma filtração que diminui a turbidez na cerveja eficientemente⁶.

Apesar da filtração com filtros de terras diatomáceas ser muito eficiente na diminuição da turbidez na cerveja, esta filtração apresenta algumas desvantagens. As terras diatomáceas são perigosas para a saúde (por inalação) na sua forma seca e não são biodegradáveis, o que torna o seu descarte muito caro. Para além de ser um processo demorado e dispendioso, este tipo de filtração representa um dos maiores desafios para os fabricantes de cerveja que desejam minimizar a captação de oxigénio^{23,37}. De facto, os valores registados nas cervejas Brut IPA 1 e Thartaruga 1 (figura 18) verificam isso mesmo, que a filtração por terras é um desafio para manter os níveis de oxigénio dentro dos valores de referência (10-50 ppb)³⁹. Os valores de OD nas cervejas Brut IPA 1 e Thartaruga 1 estavam 825 ppb e 1275 ppb acima do limite recomendado, respetivamente.

Tanto na filtração por cartuchos, como na filtração por terras diatomáceas observou-se um aumento muito significativo de OD. Estes resultados comprovam que a filtração é uma etapa que promove a solubilização de oxigénio nas cervejas e que a introdução de oxigénio na cerveja durante esta etapa é prejudicial para a cerveja. O aumento de OD durante a filtração é muito difícil de controlar, mas deve ser minimizado o máximo possível. As cervejas filtradas devem apresentar valores de OD entre os 10 a 50 ppb^{6,39}.

Na filtração, tal como nas restantes etapas, o contacto com o ar é a principal razão pela exposição da cerveja ao oxigénio. Nesta etapa a entrada de ar acontece através de várias fontes: vedantes das bombas, válvulas ou centrífugas com vazamento, ar residual na tubulação, auxiliares de filtros (sistema de dosagem de terras diatomáceas, filtros de cartuchos, etc) e ainda o ar presente nas cubas onde a cerveja filtrada é armazenada³⁷. Estas fontes são comuns aos dois tipos de filtração, no entanto, através da comparação do aumento de OD nas figuras 17 e 18, percebemos que a filtração com filtros de terras diatomáceas são muito mais prejudiciais para a incorporação de oxigénio na cerveja. Nas cervejas que foram sujeitas à filtração por terras diatomáceas, os valores de oxigénio dissolvido dispararam abruptamente, aumentando 547 ppb e 1293 ppb de OD nas cervejas Brut IPA 1 e Thartaruga 1, respetivamente. Com isto, percebemos que esta filtração provoca uma maior captação de oxigénio comparada à filtração por cartuchos, pois o aumento mais elevado registado nesta filtração foi de 84 ppb, correspondente à cerveja Rubi 2. É importante perceber quais as principais diferenças entre estes dois tipos de filtração, para assim concluir quais as fontes de entrada de ar que existe na filtração por terras, e são inexistentes na filtração por cartuchos. A utilização de água durante a filtração é uma característica da filtração por terras. Esta é introduzida antes da cerveja no filtro, e só depois é que a cerveja é adicionada empurrando a água para o exterior do filtro, havendo inevitavelmente um contacto entre estes dois líquidos. Este contacto pode provocar uma contaminação por oxigénio na cerveja se a água apresentar oxigénio dissolvido. Na impossibilidade de efetuar a medição direta de oxigénio dissolvido na água utilizada neste tipo de filtração, foi realizado uma diluição na cerveja Loira 2 para perceber se há incorporação do OD na cerveja depois do contacto com a água. A cerveja Loira 2 estava pronta e encontrava-se armazenada na cuba quando se adicionou cerca de 10% de água. Antes de adicionar a água, mediu-se o oxigénio dissolvido na cerveja e o valor registado era de 123 ppb. O OD foi novamente medido, imediatamente após a diluição, e verificou-se que o valor aumentou para 787 ppb. Esta diluição, ou seja, o

contacto da água com a cerveja provocou um aumento de 664 ppb de OD na cerveja. Isto significa que a água apresenta valores elevados de oxigénio dissolvido, e que ao ser adicionada à cerveja, aumenta a incorporação do oxigénio na cerveja. Com esta diluição percebeu-se que, a água utilizada na filtração apresenta valores de OD superiores aos desejados, e que o oxigénio incorporado neste líquido é transferido para a cerveja.

Para além da presença de água, a adição de terras ao longo da filtração, também é um processo inexistente na filtração por cartuchos. Esta adição realiza-se através de uma unidade de dosagem onde as terras são adicionadas para formar as camadas. Para realizar essa adição é necessário que a tampa da unidade de dosagem esteja aberta, o que vai provocar uma entrada de ar e aumentar o oxigénio disponível dentro do filtro. Desta forma, sempre que há adição das terras durante a filtração, ocorre simultaneamente a entrada de ar. Estas duas características (a utilização de água e a adição das terras) fazem com que a filtração por terras diatomáceas seja mais prejudicial para a incorporação de oxigénio na cerveja do que a filtração por cartuchos.

Para minimizar a dissolução de oxigénio na cerveja durante a filtração existem medidas que podem ser incorporadas, antes e durante a execução desta etapa. Essas medidas podem ser a utilização do CO₂, que é um gás mais pesado que o ar, como gás de contrapressão. Isso irá permitir libertar o ar presente em tubos, equipamentos e cubas. Por exemplo, quando se está a realizar a filtração, a cuba que vai receber a cerveja filtrada deve ser injetada com CO₂ o mais puro possível, antes de a encher com cerveja. Isso faz com que a cuba seja revestida de CO₂ na parte inferior e de ar na parte superior. Este processo deve ser realizado, não muito tempo antes da filtração, pois com o repouso prolongado dos gases eles acabam por se misturar. Outro dos problemas da filtração é a possibilidade de haver ar dentro dos tubos e recipientes. Deve ser realizada então, a remoção de todo o ar dos tubos e recipientes com água livre de O₂ antes do início e durante a filtração, pelo monitoramento contínuo das válvulas de libertação de ar. A montagem do sistema de filtração, como os tubos com válvulas de libertação de ar, devem ser instalados corretamente. O sistema deve ser o mais isolado possível e todas as ligações devem ser verificadas, para averiguar que não há nenhum vazamento, bem como nenhuma entrada de ar. O uso de um gás inerte (CO₂ ou N₂) para contrapressão ou descarga nos tubos, também evita a acumulação de ar em todo o sistema. No caso concreto da filtração com filtros de terras diatomáceas, há medidas que podem ser tomadas para evitar que esta filtração seja tão prejudicial. O uso de água sem teor

de oxigénio é fundamental, assim, a água deve ser substituída por uma água desaerada para que não haja contaminação. Para além disso, deve-se realizar uma desaeração da suspensão de terras diatomáceas no recipiente doseador, através da injeção de CO₂. Como durante esta filtração corre a constante adição de terras diatomáceas, e isso implica a abertura da tampa da unidade de dosagem, deve também ser implementado um sistema que reduza a entrada de ar, como um orifício de menores dimensões^{6,37}.

Com os resultados recolhidos foi possível verificar que a filtração é um processo que contribui para um aumento do OD na cerveja. Tanto na filtração com filtros de cartuchos como com filtros de terras diatomáceas os valores são superiores aos de referência, o que vai resultar, a longo prazo, na oxidação da cerveja. No entanto, a filtração com filtros de terras diatomáceas, apesar de ser mais eficiente na diminuição da turbidez (tabela 7) em comparação à filtração por cartuchos (tabela 6), apresenta uma maior captação de oxigénio durante o processo. Desta forma, deve-se evitar que este tipo de filtração seja realizado em cervejas que serão armazenadas por longos períodos e a temperaturas incertas. Como esta etapa é muito suscetível à contaminação da cerveja por oxigénio, as medidas de prevenção de entrada de ar deve ser sempre implementadas nestes dois tipos de filtração, com um cuidado maior na filtração por filtros de terras diatomáceas.

4.2.4. Carbonatação

O dióxido de carbono é produzido naturalmente durante a fermentação, no entanto os níveis de CO₂ nem sempre são os desejados. Desta forma, a empresa injeta CO₂ na cerveja após a filtração ou maturação (no caso de a cerveja não ser filtrada). A carbonatação tem como objetivo adaptar e controlar os níveis de CO₂ ao gosto comum dos consumidores³.

Com o intuito de perceber se esta etapa tem influência nos níveis de OD na cerveja, foram realizadas medições em 6 cervejas distintas (figura 19), antes e depois da carbonatação. As cervejas analisadas foram a cerveja Nautika 1, Trigo 1, Brut IPA 1, Extra 1, Thartaruga 1 e a mistura das cervejas Rubi 1,2 e 3.

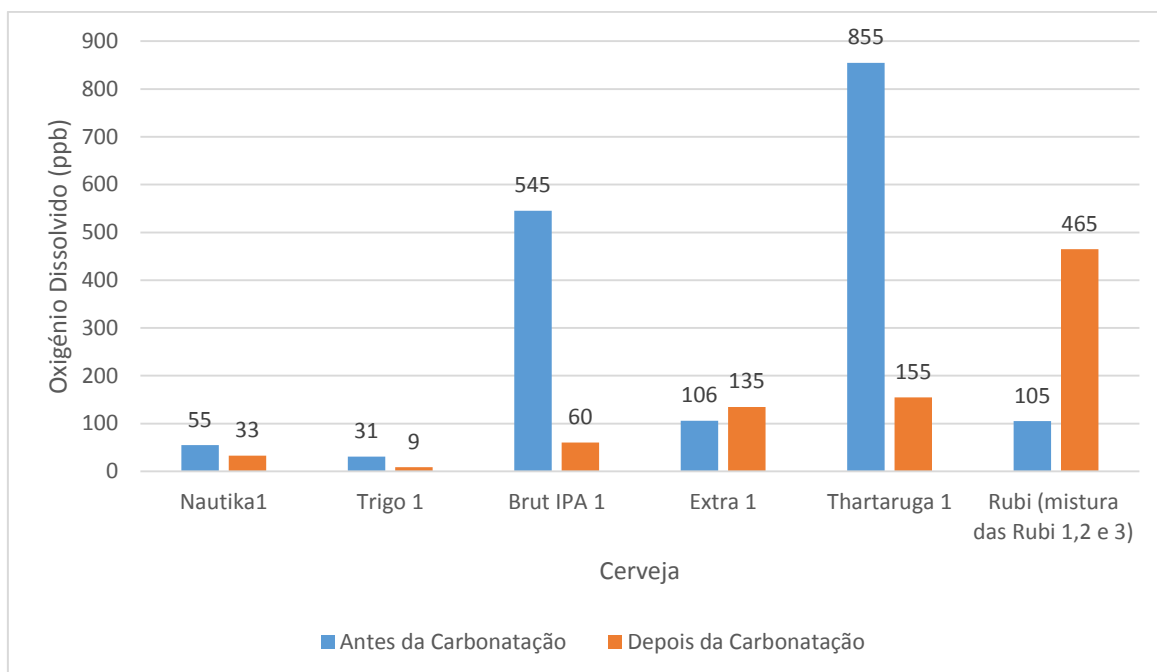


Figura 19- Oxigénio dissolvido nas cervejas Nautika 1, Trigo 1, Brut IPA 1, Extra 1, Thartaruga 1 e na mistura das Rubi 1,2 e 3 antes e depois da carbonatação.

Com a análise dos resultados percebemos que existem dois comportamentos dissemelhantes. Nas cervejas Nautika 1, Trigo 1, Brut IPA 1 e Thartaruga 1 houve uma diminuição do oxigénio dissolvido. A cerveja Nautika 1 foi a que apresentou uma menor diminuição com 40%. As cervejas Trigo 1, Brut IPA 1 e Thartaruga 1 apresentaram uma diminuição de 71, 89 e 82%, respetivamente. O mesmo não se verificou nas cervejas Extra 1 e Rubi (mistura da rubi 1,2 e 3), que perante a carbonatação apresentaram valores de OD superiores. A Extra 1 teve um aumento de 27%, enquanto a Rubi (mistura) teve um aumento superior a 100%, em que houve um aumento de 360 ppb de oxigénio dissolvido em relação ao valor inicial.

A carbonatação é uma etapa que carece de uma linha de montagem, e como tal, está sujeita a uma maior probabilidade de entrada de ar. Como se verificou em algumas etapas anteriores, o aumento de oxigénio dissolvido após a execução de uma etapa, pode ser devido ao mau isolamento do sistema. O aumento de OD que se verificou nas cervejas Extra 1 e Rubi (mistura da rubi 1,2 e 3) (figura 19) pode resultar de um mau isolamento do sistema de carbonatação, presença de fuga na cuba ou ar nos tubos, introdução de CO₂ com pureza baixa e vedações da bomba com vazamento. Assim, antes da carbonatação, a montagem do sistema deve ser controlada, deve-se verificar se existe alguma fuga, e o sistema deve estar o mais isolado possível. Para além disso, o dióxido de carbono que é injetado deve ser o mais puro

possível e nenhum oxigénio deve ser introduzido juntamente com o CO_2 ^{3,6,37}. O que pode parecer ser níveis insignificantes de O_2 no CO_2 pode realmente levar a uma contaminação significativa com oxigénio na cerveja.

Nas restantes cervejas (Nautika 1, Trigo 1, Brut IPA 1 e Thartaruga 1) houve uma diminuição significativa de OD (40 a 90%) após a adição de CO_2 . Esta diminuição pode ter sido provocada pela reação do oxigénio com os componentes da cerveja, por reações de oxidação. Por norma, quando o teor de oxigénio dissolvido diminui, significa que este reagiu e por isso deixa estar presente na forma de oxigénio, originando radicais livres e ROS, que vão juntamente com compostos da cerveja, originar produtos de oxidação. Para além disso, esta diminuição pode ter sido provocada pela adição do CO_2 , com grande solubilidade na cerveja e mais pesado que o ar, que ao ser injetado na cerveja vai diminuir a percentagem de oxigénio que estava dissolvido na bebida.

Nesta etapa, é preciso ter muito cuidado ao efetuar a medição do OD. O dióxido de carbono produzido durante a fermentação, ou o que é injetado tende a estabelecer equilíbrio com a pressão atmosférica e o CO_2 que está a ser libertado para a atmosfera pode arrastar o oxigénio. E isso pode justificar algumas diminuições de OD que verificámos nas medições. Como há muito CO_2 na cerveja, todas as medições de OD devem ser feitas acima da pressão na qual o dióxido de carbono sairá da solução. Se houver bolhas de CO_2 na cerveja durante a medição, todas as medições do OD são subestimadas porque quanto maior a quantidade de CO_2 libertado, maior o erro de medição³⁷. Para minimizar esses erros de medição, existem algumas medidas que podem ser implementadas. As medições devem ser efetuadas regularmente, pois o conteúdo de OD varia após a cerveja estar armazenada na cuba um dia ou até em algumas horas. As medições devem ser realizadas o mais longe possível de qualquer ponto de injeção de ar/ O_2 , CO_2 ou N_2 . Os tubos onde se efetuam as medições devem ser horizontais ou ascendentes, e a montagem do sistema de medição deve ser executado o mais longe possível de bombas ou centrífugas. Estes equipamentos são fontes de entradas de oxigénio e a distância entre a fonte de entrada e o ponto de medição permitirá o máximo de tempo possível para a dissolução dos gases nos líquidos.

Concluimos que a carbonatação pode provocar a captação de oxigénio quando o isolamento do sistema de carbonatação ou a pureza do CO_2 não é garantida. No entanto, na maioria das amostras o oxigénio dissolvido diminui, o que é vantajoso. Assim, esta etapa e a maneira como é executada não traz grandes problemas para a oxidação da cerveja. É

importante ainda ter em atenção que as medições de OD podem ser subestimadas quando realizadas de forma incorreta. A implementação de todos os cuidados, acima mencionados, é crucial para que os valores recolhidos sejam o mais próximo da realidade.

5. Conclusões

A realização deste projeto teve como principal objetivo a identificação de métodos para eliminar ou reduzir o oxigénio dissolvido na cerveja. Para tal, foram realizadas medições do oxigénio dissolvido para identificar os principais focos de incorporação. As etapas selecionadas para as medições foram desde a fermentação até à carbonatação. Com a recolha e análise destas medições, conclui-se que as cervejas produzidas apresentam valores de OD desaconselhados nas várias etapas da produção de cerveja.

Os valores no final da fermentação e maturação foram superiores ao recomendado. Para evitar esses valores a empresa deve definir a quantidade de oxigénio mais apropriada a injetar no mosto, para assim evitar falta ou excesso de oxigénio. No *dry-hopping* e na filtração conclui-se que estas etapas estão relacionadas com o aumento da incorporação de oxigénio e conseqüentemente com a oxidação da cerveja. No *dry-hopping* o sistema deve ser o mais isolado possível e deve-se evitar qualquer possível entrada de ar. A filtração foi a etapa mais problemática na incorporação de oxigénio. Dentro desta etapa a filtração por terras diatomáceas foi a mais prejudicial no aumento de oxigénio dissolvido na cerveja, no entanto a mais eficiente na diminuição da turbidez. Para minimizar a incorporação de oxigénio, neste tipo de filtração é essencial utilizar água desaerada. Os métodos de mitigação em comum nos dois tipos de filtração (por terras e por cartuchos) são: manter o sistema de filtração o mais isolado possível para evitar entradas de ar e fugas e utilizar o CO₂ como gás de contrapressão para eliminar todo o ar residual na tubagem, equipamentos e cubas. Por fim, a carbonatação não apresentou grandes problemas na captação de oxigénio dissolvido devido à presença do CO₂, no entanto a sua má execução pode levar ao aumento de oxigénio. O CO₂ introduzido deve ser sempre o mais puro possível, para não haver possíveis contaminações com O₂ e o sistema de carbonatação, tal como os restantes equipamentos, deve apresentar um bom isolamento para evitar a incorporação de oxigénio. Apesar de algumas exceções, a carbonatação é uma etapa que não traz grandes perigos para a oxidação da cerveja da forma como é realizada.

Para trabalho futuro, é de grande importância o acompanhamento pontual do OD em todo o processo, de forma a verificar se as medidas implementadas são eficientes para que os valores de oxigénio dissolvido sejam o menor possível. A concentração de OD na cerveja engarrafada nunca deve exceder os 50 ppb.

Referências Bibliográficas

1. Vadia C. Site oficial da cervejaria Vadia. Available at: <https://www.cervejavadia.pt/pt/#01>. (Accessed: 20th January 2020)
2. Eßlinger, H. M. Handbook of Brewing - Processes, Technology, Markets. *Wiley-VCH*. 2009. 1-779.
3. Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A. & Stevens, R. Brewing: Science and Practice. *Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC*. 2004. 1-881.
4. Bamforth, C. W. Progress in Brewing Science and Beer Production. *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2017. **(8)**, 161–176.
5. Palmer, J. How to Brew: Everything You Need To Know To Brew Beer Right The First Time. *Brewers Publications*. 2006. (3), 1-248.
6. Kunze, W. Technology brewing and malting. *VLB Berlin*. 2004. **(3)**, 1-946.
7. Palmer J; Kaminski C. Water - A Comprehensive Guide for Brewers. *Brewers Publications*. 2013. **(1)**, 1-239.
8. Wunderlich, S. and Back, W. General Aspects of Beer and Constituents - Beer Making, Hops and Yeast. *Elsevier*. 2009. 3-16.
9. Eumann, M. Water in brewing. Brewing: New Technologies. *Woodhead Publishing Limited*. 2006. 183-207.
10. Parker, D. K. Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis. *Woodhead Publishing Limited*. 2012. 133-159.
11. Mallett, J. Malt - A Practical Guide from Field to Brewhouse. *Brewers Publications*. 2014. 1-274.
12. Barth R. The Chemistry of Beer: The Science in the Suds. *John Wiley & Sons, Inc.* 2013. **(1)**, 1-350.
13. White, C. & Zainasheff, J. Yeast. The practical guide to beer fermentation. *Brewers Publications*. 2010. **(1)**, 1-226.
14. Lodolo, E. J., Kock, J. L. F., Axcell, B. C. & Brooks, M. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res.* 2008. **(8)**, 1018–1036.
15. Hui, Y. H. Handbook of food products manufacturing. *John Wiley & Sons, Inc.* 2007. (1), 1-2237.

16. Fix, G. Principles of Brewing Science: a study of serious brewing issues. *Brewers Publications*. 1999. (2), 1-209
17. Bamforth, C. W. Beer: A Quality Perspective. A volume of the Handbook of Alcoholic Beverages Series. *Elsevier*. 2009. 1-301.
18. Bamforth, C. W., Muller, R. E. & Walker, M. D. Oxygen and Oxygen Radicals in Malting and Brewing: A Review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 1993. (51), 79–88.
19. Sancho, D., Blanco, C. A., Caballero, I. & Pascual, A. Free iron in pale, dark and alcohol-free commercial lager beers. *J. Sci. Food Agric.* 2011. (91), 1142–1147.
20. Pohl, P. Determination and fractionation of metals in beer: A review. *Food Addit. Contam.* 2008. (25), 693–703.
21. Kuchel, L., Brody, A. L. & Wicker, L. Oxygen and its reactions in beer. *Packag. Technol. Sci.* 2006. (19), 25–32.
22. Min, D. B. & Boff, J. M. Chemistry and reaction of singlet oxygen in foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2002. (1), 58–72.
23. Freeman, G. J. & McKechnie, M. T. Filtration and Stabilization of Beers. *Fermented Beverage Prod.* 2003. 365–392.
24. Frederiksen, A. M., Festersen, R. M. & Andersen, M. L. Oxidative reactions during early stages of beer brewing studied by electron spin resonance and spin trapping. *J. Agric. Food Chem.* 2008. (56), 8514–8520.
25. Hirota, N., Kuroda, H., Takoi, K., Kaneko, T., Kaneda, H., Yoshida, I., Takashio, M., Ito, K., Takeda, K. Brewing performance of malted lipoxygenase-1 null barley and effect on the flavor stability of beer. *Cereal Chem.* 2006. (83), 250–254.
26. Sun, W., Du, J., Jin, Y., Liu, J. & Kong, L. Preliminary research on wheat lipoxygenase during malting. *J. Inst. Brew.* 2012. (118), 192–197.
27. Yu, J., Huang, S., Dong, J., Fan, W., Huang, S., Liu, J., Chang, Z., Tian, Y., Hao, J., Hu, S. The influence of LOX-less barley malt on the flavour stability of wort and beer. *J. Inst. Brew.* 2014. (120), 93–98.
28. Vanderhaegen, B., Neven, H., Verachtert, H. & Derdelinckx, G. Food Chemistry The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chem.* 2006. (95), 357–381.
29. Depraetere, S. A., Delvaux, F., Schutter, D., Willians, I.S., Hu, S., Winderickx, J., Delvaux, F.R. The influence of wort aeration and yeast preoxygenation on beer staling processes. *Food Chem.* 2008. (107), 242–249.

30. Verbelen, P. J., Saerens, S. M. G., Van Mulders, S. E., Delvaux, F. & Delvaux, F. R. The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. **(82)**, 1143–1156.
31. O'Rourke, T. The role of oxygen in brewing. *Brew. Int.* 2002. 45–47.
32. Barnette, B. M. & Shellhammer, T. H. Evaluating the Impact of Dissolved Oxygen and Aging on Dry-Hopped Aroma Stability in Beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 2019. **(77)**, 179–187.
33. Baert, J. J., De Clippeleer, J., Hughes, P. S., De Cooman, L. & Aerts, G. On the origin of free and bound staling aldehydes in beer. *J. Agric. Food Chem.* 2012. **(60)**, 11449–11472.
34. Gibson, B., Aumala, V., Heiniö, R. L., Mikkelsen, A. & Honkapää, K. Differential evolution of Strecker and non-Strecker aldehydes during aging of pale and dark beers. *J. Cereal Sci.* 2018. **(83)**, 130–138.
35. Wietstock, P. C., Kunz, T. & Methner, F. J. Relevance of Oxygen for the Formation of Strecker Aldehydes during Beer Production and Storage. *J. Agric. Food Chem.* 2016. **(64)**, 8035–8044.
36. Jaskula-Goiris, B., Causmaecker, B., Rouck, G., Paternoster, A., Braet, J., Cooman, L. Influence of transport and storage conditions on beer quality and flavour stability. *J. Inst. Brew.* 2019. **(125)**, 60–68.
37. Benedict, C. S. Dissolved Gases. *Brewing Materials and Processes.* Elsevier Inc. 2016. 157-174.
38. Hach. Hach LDO® Technology for the Power Industry. Available at: <https://www.hach.com/powerldo>. (Accessed: 23rd March 2020)
39. Hach. How To Measure Dissolved Oxygen in the Brewery. *Hach Company.* 2018. 1-5.
40. Hieronymus S. For the love of hops: the practical guide to aroma, bitterness, and the culture of hops. *Brewers Publications.* 2012. 1-321.