

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Química



Dissertação

**AVALIAÇÃO DA DECOMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE CERVEJA EM
SISTEMA DE REFLUXO PARA ANÁLISE POR TÉCNICAS DE
ESPECTROMETRIA ATÔMICA**

Paulo Roberto Pereira De Leão

Pelotas, 2016.

Paulo Roberto Pereira de Leão

Avaliação da decomposição de amostras de cerveja em sistema de refluxo
para análise por Técnicas de Espectrometria Atômica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. (Área de concentração: Química Analítica).

Orientadora: Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro

Co-orientadora: Dr^a. Aline Lisbôa Medina

Pelotas, 2016.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

L433a Leão, Paulo Roberto Pereira de

Avaliação da decomposição de amostras de cerveja em sistema de refluxo para análise por Técnicas de Espectrometria Atômica / Paulo Roberto Pereira de Leão ; Anderson Schwingel Ribeiro, orientador ; Aline Lisbôa Medina, coorientadora. — Pelotas, 2016.

52 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. Cerveja. 2. Planejamento composto central rotacional. 3. Decomposição ácida. 4. MIP OES. 5. F AAS/F AES. I. Ribeiro, Anderson Schwingel, orient. II. Medina, Aline Lisbôa, coorient. III. Título.

CDD : 547

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado “Avaliação da decomposição de amostras de cerveja em sistema de refluxo para análise por Técnicas de Espectrometria Atômica.” de autoria de Paulo Roberto Pereira De Leão.

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Anderson Schwingel Ribeiro (Orientador - UFPel)

.....
Prof. Dr. Daiane Dias (FURG)

.....
Prof. Dr. Adriane Medeiros Nunes (UFPel)

“Vão ter que me engolir”

(Mário Jorge Lobo)

RESUMO

Título: Avaliação da decomposição de amostras de cerveja em sistema de refluxo para análise por Técnicas de Espectrometria Atômica.

Autor: Paulo Roberto Pereira de Leão

Orientador: Anderson Schwingel Ribeiro

Co-orientadora: Aline Lisbôa Medina

Neste trabalho é descrito o desenvolvimento de um método analítico para mineralização de amostras de cervejas e determinação de metais por técnicas de espectrometria atômica. As amostras foram preparadas por decomposição em meio de ácido nítrico em um sistema de refluxo e as determinações foram realizadas por F AAS (Fe, Mg e Zn), F AES (Na), e MIP OES (Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn). As melhores condições para a decomposição da amostra foram obtidas através de estudo com planejamento composto central rotacional: volume de 10,0 mL de cerveja desgaseificada, seguido da adição de 5,0 mL de HNO₃ e 2,0 mL H₂O₂ e uma etapa de aquecimento de 93 min com o bloco digestor a 160 °C. Os limites de quantificação do método foram $\leq 0.100 \text{ mg L}^{-1}$ para todos os elementos investigados independente da técnica analítica utilizada, ficando abaixo, por exemplo, dos valores estipulados para Zn e Ni pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil. Os testes de recuperações em três diferentes níveis de concentração apresentaram valores médios de 101% para Fe, Mg e Zn por F AAS, 99% para Na por F AES, e 101% para Ca, K, Mn e Ni por MIP OES. Os estudos comparativos entre as diferentes técnicas avaliadas mostraram, pelo teste T com nível de 90% de confiança, que não há diferença significativa para as determinações dos analitos em amostras de cerveja. De modo geral os RSD's foram baixos, variando na média de 3,2% para todas as determinações realizadas. O método de preparo da amostra proposto mostrou ser simples, rápido, de baixo custo e confiável para análise de cervejas nas diferentes técnicas de espectrometria atômica avaliadas.

Palavras-chave: Cerveja, planejamento composto central rotacional, decomposição ácida, MIP OES, F AAS/F AES.

ABSTRACT

Title: Evaluation of beer sample decomposition with reflux system for analysis by Atomic Spectrometry Techniques.

Author: Paulo Roberto Pereira de Leão

Academic Advisor: Anderson Schwingel Ribeiro

Academic Co-advisor: Aline Lisbôa Medina

This study describes the development of an analytical method for beer sample mineralization and metal determination by atomic spectrometric techniques. Samples were prepared by nitric acid decomposition with reflux system, and F AAS (Fe, Mg and Zn), F AES (Na) and MIP OES (Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni and Zn) performed the determinations. The best conditions for sample decomposition were obtained through studies with central composite design: 10.0 mL of degassed beer followed by the addition of 5.0 mL of HNO₃ and 2.0 mL H₂O₂ and a heating step in the digester block at 160 °C for 93 min. The limits of quantification of the method were $\leq 0.100 \text{ mg L}^{-1}$ for all analytes investigated, regardless of the analytical technique used, and below the values established for Zn and Ni by the Brazilian Health Surveillance Agency. The recovery test at three different concentration levels showed results around 101% for Fe, Mg, and Zn by F AAS, 99% for Na by F AES and 101% for Ca, K, Mn and Ni by MIP OES. The comparative study of the different techniques showed that by the t-test at 90% level of confidence, there is no significant difference for the analyte determinations in beer samples. Overall the RSD's were low, ranging on average of 3.2% for all determinations. The sample preparation method proved to be simple, fast, low-cost and reliable for beers analysis by different techniques of atomic spectrometry.

Keywords: beer, central composite design, acid decomposition, MIP OES, F AAS/F AES.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Limites toleráveis de metais e contaminantes em bebidas do Mercosul.....	15
Tabela 2: Classificação da cerveja conforme a legislação brasileira.....	16
Tabela 3: Métodos analíticos utilizados no preparo de amostras de cervejas para determinação de metais	25
Tabela 4: Variáveis independentes e respectivos níveis estudados no DCCR para otimização da vazão dos gases no F AAS.....	26
Tabela 5: Parâmetros de instrumentais para determinações por MIP OES.	27
Tabela 6: Variáveis independentes e respectivos níveis estudados no DCCR para otimização da decomposição da amostra.	30
Tabela 7: Matriz com combinações e respostas experimentais do DCCR para a vazões da chama ar-acetileno.....	32
Tabela 8: Matriz com combinações e respostas experimentais do DCCR para a decomposição da amostra.	35
Tabela 9: Concentrações, antes e após as adições de, Fe, Mg e Zn nas amostras de cervejas (n=3) do tipo pale ale (1), Lager (2), Poter (3) e Weiss (4).	39
Tabela 10: Valores recuperados na amostra da cerveja do tipo porter (amostra 3) para n=3, na técnica MIP OES para decomposição ácida com sistema de refluxo.	40
Tabela 11: Valores encontrados para Na, Mg, Fe, Zn, em 4 amostras de cervejas (Pale ale, Lager, Porter, Weiss) analisadas por MIP OES e F AAS/F AES (n = 3).....	41
Tabela 12: Parâmetros analíticos para determinação de Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Zn, por MIP OES, F AAS e FAES.....	43
Tabela 13: Valores encontrados em mg L ⁻¹ para Na, Mg, Fe, Zn, Ni, Mn, Ca e K nas 15 amostras de cervejas analisadas por MIP OES.	46

Lista de Abreviaturas e Siglas

F AAS	Espectrometria de Absorção Atômica em Chama
F AES	Espectrometria de Emissão Atômica em Chama
MIP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-Ondas
AAS	Espectrometria de Absorção Atômica
AC	Antes de Cristo
EBC	European Brewery Convention
TS-FF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama e Forno Tubular com <i>Termo Spray</i>
GF AAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite
ICP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado
ICP-MS	Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado
PTFE	Politetrafluoretileno
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
LD	limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MERCOSUL	Mercado Comum do Sul

Sumário

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Origem da cerveja.....	13
2.2. Produção e mercado cervejeiro.....	14
2.3. Legislação.....	14
2.4. Ingredientes e valor nutritivo da cerveja.....	17
2.3.1 Água.....	17
2.3.2. Malte.....	18
2.3.3. Adjuntos.....	19
2.3.4. Levedura	19
2.3.5. Lúpulo	19
2.5. Tipos de cervejas.....	20
2.6. Minerais	21
2.7. Espectrometria de Absorção Atômica.....	22
2.7.1. Espectrometria de Absorção/Emissão Atômica por Chama.....	22
2.7.2. Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por micro-ondas (MIP OES) ...	23
2.8. Determinação de minerais em cerveja	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26

3.1. Instrumentação	26
3.2. Reagentes.....	27
3.3. Amostras	28
3.4. Preparo da amostra.....	28
3.5. Parâmetros de mérito	30
3.6. Aplicação do método.....	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	31
4.1. Otimização das vazões dos gases	31
4.2. Otimização da decomposição com HNO ₃ em sistema de refluxo	35
4.3. Estudo comparativo entre metodologias utilizadas.....	40
4.4. Resultados analíticos: Parâmetros de mérito	41
4.5. Aplicação das Otimizações na determinação dos metais.....	44
5. CONCLUSÃO	47
6. REFERÊNCIAS	48

1. Introdução

A cerveja é uma bebida fermentada a partir de cereais maltados, normalmente de malte de cevada, com ou sem materiais ricos em amido e aromatizada por lúpulo (1,2). A base da cerveja é fornecida pelo malte de cevada, sendo que, atualmente, muitos cervejeiros começaram a usar adjuntos ricos em amido, substituindo os ingredientes originais por outros, tais como, arroz, milho ou trigo (3). Atualmente é uma das bebidas mais consumidas no mundo, sendo que, em 2013, o Brasil estava entre os maiores produtores, atrás apenas dos Estados Unidos da China (4). Recentemente foi catalogado mais de 140 estilos de cerveja, sendo eles *pilsen*, *weiss*, *lager*, *porter* e *pale ale*, os quais diferem na composição dos ingredientes, o que atribui características específicas para cada estilo (5). Estudos indicam que a cerveja pode trazer benefícios à saúde humana quando ingerida de forma moderada, devido a presença de certos componentes como antioxidantes, fibras, vitaminas e minerais (6); sendo que Ca, Zn, Fe e Mg essenciais para alimentação humana (7).

Elementos minerais e metálicos encontrados na cerveja podem ser provenientes de fontes naturais (solo, água, cereais, lúpulo e levedura) bem como da contaminação ambiental, fertilizantes e pesticidas, do processo industrial ou de embalagens (8,9). Aproximadamente 0,4% da cerveja são constituídas de mineiras com funções específicas e essenciais para sua produção (10), como o Fe, responsável pela estabilização da espuma, além de controlar o aroma durante a etapa de fermentação da cerveja (11,12), Zn e Mg, os quais são responsáveis pela ativação de algumas enzimas importantes na fermentação, e Na, que pode influenciar no sabor da cerveja (11). Entretanto, alguns metais podem influenciar negativamente nas características sensoriais, como Fe e Mn, que além de afetar a fermentação, podem deixar gosto metálico na cerveja e acelerar sua deterioração (13). Desse modo o controle desses elementos é de extrema importância, considerando que podem interferir nas características da cerveja de maneira desejável ou indesejável, afetando sua produção, e podendo assim não manter um padrão de qualidade para o produto.

O objetivo do trabalho foi avaliar o uso de um sistema de refluxo para as decomposições de amostras de cerveja em copo aberto, sendo que a otimização experimental foi realizada através de planejamento estatístico com metodologia de superfície de resposta, para a posterior determinação de Fe, Mg e Zn por F AAS, Na

por F AES, e Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn por MIP OES. Buscou-se o desenvolvimento de um método eficiente para o preparo de amostra em cerveja que apresentasse baixo custo, praticidade e segurança para o monitoramento e controle da qualidade dessa bebida. Entre as amostras avaliadas estão cervejas de grandes marcas comerciais e cervejas artesanais produzidas no Brasil.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Origem da cerveja

Alguns historiadores sugerem que a primeira cerveja tenha sido produzida na China entre 9000 a 7000 AC. Entretanto os primeiros registros escritos envolvendo o consumo da mesma foram em 2800 AC na Mesopotâmia. Todavia, existem fortes indícios de que a cerveja surgiu em 9000 AC durante a Revolução Neolítica, quando a humanidade começou a formar os primeiros burgos (primeiras casas construídas de forma rudimentares). Com esse novo estilo de vida, surgiu a necessidade de armazenamento dos grãos cultivados, os quais eram armazenados em celeiros ou triturados para produção de farinha, originando de forma involuntária os primeiros litros de cerveja (14,15). Os primeiros vestígios da produção de cerveja na Europa são por volta de 3600 AC, em diferentes locais do continente Europeu, influenciados pelos egípcios. Naquela época a cerveja era a bebida das classes menos favorecidas, enquanto que os aristocratas da época consumiam vinho (15).

No Brasil o habito de tomar cerveja surgiu com D. João VI, no século XIX, época a qual a cerveja era importada dos países europeus. Em 1888 foi fundada no Rio de Janeiro a primeira cervejaria “Manufatura de Cerveja Brahma Viligier e Cia”. Em 1981, em São Paulo, foi criada a Companhia Antártica Paulista e essas duas cervejarias mais uma belga encontram-se fundidas, gerando a Interbrew (16), sendo que atualmente a AB InBev é a maior cervejaria do mundo (17).

O processo cervejeiro era exercido por padeiros, devido à natureza da matéria prima, como grãos de cereais e levedura. A cevada era deixada submersa em água até germinar e então moída grosseiramente, moldada em bolos, aos quais se adicionava a levedura. Os bolos após parcialmente assados e desfeitos, eram colocados em jarra com água e deixados fermentar. Esta cerveja rústica ainda é fabricada no Egito com o nome de “bouza” (18,19).

A cerveja possui uma das regulamentações mais antigas já conhecidas, criada em 1516 em Munich pelo Duque Wilhelm IV, a *Reinheitsgebot* (lei da pureza Alemã), baniu o uso de trigo e centeio na fabricação de cerveja, garantido a disponibilidade desses cereais para produção de pão, limitando apenas o uso de cevada, água e lúpulo para produção de cerveja (5). Atualmente a lei de *Vorläufiges Biergesetz*, criada em 1993, autorizou o uso de leveduras para fabricação de cervejas de baixa fermentação, e para cervejas de alta fermentação o uso de diferentes tipos de malte e adjuntos açucarados (14).

2.2. Produção e mercado cervejeiro

Em 2013, a produção mundial de cerveja chegou a 192,940 mil quilolitros. A Ásia (34%) é a região de maior produção, seguida da Europa (27,6%), América Latina (17,1%) e América do Norte (12,6%) (20). No Brasil a indústria cervejeira é responsável por 2% do produto interno bruto e 15% da indústria de transformação nacional, sendo que gerou investimento de 17 bilhões de Reais entre 2010 a 2013, empregando cerca de 2,7 milhões de pessoas. Em 2013 foi produzido cerca de 13,5 bilhões de litros de cerveja no Brasil, levando o país ao terceiro lugar no ranking da produção mundial, atrás somente da China e Estados Unidos. O brasileiro consome cerca de 68 litros por pessoa anualmente. Os maiores consumidores são a República Tcheca (149 litros por ano), Áustria (108 litros por ano) e Alemanha (106 litros por ano) (4).

2.3. Legislação

No Brasil não é obrigatório informar Tabela nutricional no rótulo da cerveja. Entretanto há algumas leis e decretos que regulamentam a quantidade de aditivos alimentares e coadjuvantes empregados na fabricação (21), assim como a quantidade máxima de minerais (22). Com a criação do Bloco Econômico do Mercosul surgiu a Resolução - RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013, cuja a qual padroniza as quantidades de contaminantes em bebidas (23). Na Tabela 1 estão os limites máximos toleráveis para metais e contaminantes em bebidas.

Tabela 1: Limites toleráveis de metais e contaminantes em bebidas do Mercosul.

Elemento Químico	Limite máximo tolerável (mg Kg ⁻¹)
Arsênio	0,10
Chumbo	0,20
Cádmio	0,02
Cobre	5
Níquel	0,1
Zinco	1

Fonte: Decreto Nº 55.871 (22), Regulamento Técnico (23).

Os níveis de contaminantes inorgânicos nos alimentos deverão ser os mais baixos possíveis, devendo prevenir-se a contaminação do alimento na fonte, aplicar a tecnologia mais apropriada na produção, manipulação, armazenamento, processamento e envase, de forma a evitar que um alimento contaminado seja comercializado ou consumido (22).

No Brasil, o Decreto Nº 6.871, de Outubro de 2009, define a cerveja como uma bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro originário de malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo, podendo este ser substituído por seus respectivos extratos, o cereal podendo ser maltado ou não, e substituído por carboidrato de origem vegetal (21). A cerveja pode ser classificada quanto seu extrato primitivo, cor, teor alcoólico, proporção do malte, fermentação e aditivos, conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Classificação da cerveja conforme a legislação brasileira.

Tipo	Requisitos
Quanto o extrato primitivo	
Cerveja leve	Extrato primitivo $\geq 5\%$ p/p e $< 10,5\%$ p/p
Cerveja leve light	Extrato primitivo $\geq 5\%$ p/p e $< 10,5\%$ p/p, redução de 25% dos nutrientes, ou do valor energético com relação à cerveja similar, e com valor energético ≤ 30 Kcal L ⁻¹
Cerveja comum	Extrato primitivo $\geq 10,5\%$ p/p e $< 12\%$ p/p
Cerveja extra	Extrato primitivo $\geq 12\%$ p/p e $< 14\%$ p/p
Cerveja extra forte	Extrato primitivo $\geq 14\%$ p/p
Quanto à cor	
Cerveja clara	> 20 unidades EBC (European Brewery Convention)
Cerveja escura	< 20 unidades EBC (European Brewery Convention)
Quanto ao teor alcoólico	
Cerveja sem álcool	$< 5\%$ v/v de álcool, não sendo obrigado declarar no rótulo o teor
Cerveja com álcool	$\geq 5\%$ v/v, devendo obrigatoriamente declarar no rótulo o teor alcoólico
Quanto à proporção de malte e cevada	
Cerveja puro malte	100% p/p de malte de cevada como fonte de açúcar
Cerveja	$\geq 50\%$ p/p de malte de cevada como fonte de açúcar
Cerveja com nome do vegetal predominante	Malte de cevada $> 20\%$ e $< 50\%$ como fonte de açúcar
Quanto à fermentação	
Baixa fermentação	Processo de fermentação que utiliza leveduras ativas a temperaturas baixas (9° a 15 °C), com fermentação mais lenta e mais aromas
Alta fermentação	Processo de fermentação que utiliza leveduras ativas a temperaturas mais elevadas (15° a 25°C), com aromas típicos frutados e, por vezes, condimentados

Fonte: Decreto Nº 6.871 (21)

2.4. Ingredientes e valor nutritivo da cerveja

A cerveja contém importantes vitaminas do complexo B, polifenóis, fosfatos, ácidos orgânicos e ácidos nucleicos além de ser uma autêntica fonte de nutrientes e fibras solúveis. É importante ressaltar que o consumo moderado da cerveja não é prejudicial para o organismo e serve como complemento da alimentação, já que contém pouco açúcar, nenhuma gordura e é rica em carboidratos, vitaminas, minerais e outras substâncias benéficas ao organismo (6).

A fabricação da cerveja é realizada a partir de três ingredientes básicos: água, malte e lúpulo, existindo ainda a possibilidade de adição de adjuntos. Há muitas variações na proporção dos ingredientes, no grau de maltagem do cereal, no tipo de lúpulo, fermentação, temperatura, entre outros (16). A legislação brasileira considera como adjuntos cervejeiros os cereais aptos ao consumo humano e os amidos e açúcares de origem vegetal, sendo o milho e o arroz os mais empregados pelas cervejarias brasileiras (21).

2.3.1 Água

A água é o ingrediente primário da cerveja, correspondendo a cerca de 90% da matéria prima empregada na fabricação, sendo importante no processo de fermentação (14). Por este motivo as indústrias cervejeiras localizam-se em regiões onde a composição da água é relativamente uniforme e de boa qualidade.

Na natureza a água contém diversos sais dissolvidos, de composição e teor diferente, de acordo com sua região. Se o teor desses compostos for alto, a água passa a ter sabor conforme os sais nela dissolvidos. Além disso, as águas naturais podem possuir matéria orgânica, que além do sabor, atribuem odor. Deste modo, os sais dissolvidos e os compostos orgânicos presentes na água influenciam diretamente nos processos químicos e enzimáticos que ocorrem durante a fermentação, e conseqüentemente na qualidade da cerveja produzida. Portanto, a água para fabricação de cerveja pode ser tratada por diferentes processos, visando purificá-la, e se necessário efetuar modificações nos níveis orgânicos apresentados, tornando-a de boa qualidade para o processamento. Alguns dos requisitos básicos para obter água cervejeira de qualidade são: seguir padrões de potabilidade; ser limpa, inodora e

incolor; apresentar alcalinidade de 50 mg/L ou menor (preferencialmente inferior a 25 mg L⁻¹) e possuir concentração de cálcio ao redor de 50 mg L⁻¹ (18,19).

A água utilizada em micro cervejarias, provenientes de tratamentos municipais ou de poços, deve ser regularmente analisada quanto à dureza em carbonatos e avaliada quanto ao cheiro, sabor, coloração, turbidez, e em intervalos maiores, submetida a análises microbiológicas. Já a água fornecida por encanamentos subterrâneos oriunda de fontes rasas, possui composição diferenciada dependendo de cada região (24).

2.3.2. Malte

O malte é definido como a matéria prima resultante da germinação, sob condições controladas de qualquer cereal (cevada, milho, trigo, aveia, entre outros). A princípio qualquer cereal pode ser malteado, considerando, entre outros fatores, o seu poder diastásico (alto teor de conversão do amido contido no grão em maltose) e o seu valor econômico (14).

O malte utilizado em cervejarias é predominantemente obtido da cevada, uma gramínea pertencente ao gênero *Hordeum*, cujos grãos na espiga, alinhados em duas ou seis fileiras, são envoltos por diversas camadas celulósicas. A primeira camada, denominada palha, a qual é eliminada no beneficiamento, e outras camadas aderentes ao grão, em conjunto denominado de casca, não eliminadas no beneficiamento e que posteriormente desempenham um papel importante na técnica cervejeira (14).

Após a colheita da safra, os grãos (sementes) são armazenados em silos, sob condições controladas de temperatura e umidade, aguardando o envio para a maltearia, indústria de transformação da cevada em malte. O processo de transformação do grão de cevada em malte consiste em submeter a semente em condições favoráveis de germinação, controlando a temperatura, umidade e areação, interrompendo a germinação, tão logo o grão tenha iniciado a criação de uma nova planta. Nesta fase, o amido presente no grão malteado apresenta-se em cadeias menores que na cevada, o que o torna mais solúvel, possuindo enzimas no interior do grão que são fundamentais para o processo cervejeiro (14,25).

Existem outras fontes de açúcar para o processamento da cerveja, tais como amido, sacarose, glicose e xaropes oriundas de milho, trigo entre outros cereais. Entretanto cada país regula os limites máximos permitidos, como por exemplo, os Estados Unidos, que tolera cerca de 34% v/v, enquanto que no Brasil esse limite é de 45% (26).

2.3.3. Adjuntos

Adjuntos são fontes alternativas de extrato fermentável, empregados na substituição de parte do malte e utilizados normalmente como fontes mais econômicas de extrato. Além disso, agregam características de qualidade a cerveja, tais como cor, sabor e espuma. Os adjuntos cereais mais comuns são o milho, o arroz e o trigo, os quais são adicionados na fase de preparação do mosto cervejeiro. As enzimas hidrolisam o amido contido no próprio malte em açúcares fermentáveis. Normalmente, eles contribuem apenas como extrato, sem atividade enzimática, são mais baratos que o malte, além de não influenciarem no sabor do produto (27).

2.3.4. Levedura

As características de sabor e aroma de qualquer cerveja são determinadas pelo tipo de levedura utilizada. O gênero *Saccharomyces* apresenta várias cepas consideradas seguras e capazes de produzir dois metabólitos primários importantes para fermentação, etanol e dióxido de carbono. Os dois estilos mais importantes de cerveja, *Lager* e *Ale*, são fermentados com cepas de *S. uvarum* (*carlsbergensis*) e *S. cerevisiae*, respectivamente. Atualmente, taxonomistas de leveduras têm designado todas as cepas empregadas na produção de cerveja à espécie *S. cerevisiae* (14).

2.3.5. Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) (Figura 1) é uma planta trepadeira, perene que pertence ao grupo das Urtiáceas e da família *Cannabianaceae*, de origem europeia, cultivadas em regiões frias como Bélgica, Alemanha, República Tcheca, Reino Unido, Polônia e Estados Unidos da América, Argentina, Chile e outros países entre os paralelos de latitude 35° e 55° (28). O estudo das propriedades de alguns compostos

presentes no lúpulo revelou efeitos bioativos em grande parte de seus metabólitos, como propriedades antibióticas e anti-inflamatórias. (29). Existem relatos na literatura que descrevem a sua utilização durante a idade média, pelos monges alemães no processo de fabricação da cerveja monástica, inicialmente utilizado para contrabalancear o sabor doce do malte utilizado na época (15).



Figura 1: Plantação de lúpulo (5)

O lúpulo é a matéria prima imprescindível na produção de cerveja, proporcionando aromatização característica e sabor amargo a cerveja, além de atuar como clarificador, precipitando as proteínas do mosto (1,14). O lúpulo pode ser comercializado na forma de flores secas (*in natura*), *pellets* ou em extratos, podendo tradicionalmente ser classificado conforme suas características predominantes, em lúpulos aromáticos e de amargor (1).

2.5. Tipos de cervejas

As cervejas são classificadas de acordo com o processo fermentativo, como cerveja de alta ou baixa fermentação. A grande parte das cervejas é de baixa fermentação, ou seja, quando expostas a temperaturas entre 9 a 14 °C, o levedo fica depositado no fundo do tanque (30). A cerveja do tipo *Lager* é a mais consumida no mundo, oriunda de baixa fermentação, têm graduação alcoólica entre 4 e 5 %. Existem muitos estilos de *Lager*, sendo a maioria de coloração clara e com sabor moderadamente amargo. São do tipo *Lager*: *Pilsener*, *Munchener*, *Vienna*, *Dortmund*, *Einbeck*, *Bock*, *Export* e *Munich*, a maioria delas um tributo às cidades de onde vieram as fórmulas (31).

Já as cervejas de alta fermentação, são aquelas cujas leveduras flutuam durante o processo fermentativo em temperatura de 20 a 25 °C após fermentar o mosto, gerando um produto de cor avermelhada, sabor forte, ligeiramente ácido e com teor alcoólico entre 4 a 8 % (30). Com sabor adocicado, encorpado e frutado, a cerveja tipo *Ale* é produzida a partir de cevada maltada e levedura de fermentação alta, são do tipo *Ale*: *Stout*, *American Strong Ale*, *India Pale Ale* e *Irish Red Ale* (31).

2.6. Minerais

Muitas vezes os minerais são oriundos das matérias primas empregados na fabricação da cerveja, entretanto quantidades pequenas podem ser derivadas da planta de fabricação. Algumas matérias primas podem contribuir com quantidades traços de elementos necessários para nutrição das leveduras, como exemplo o Cu, Fe, Mn e Zn (12,32). Os metais expostos na Tabela 3 podem ser cofatores essenciais para numerosas enzimas fermentativas, sendo componentes necessários do sistema de transporte e que também satisfaçam diferentes papéis ou funções estruturais, necessária para o crescimento de levedura e quando em concentrações elevadas, podem ser potencialmente tóxicos (12).

O Zn é um nutriente essencial para vitalidade e sobrevivência das leveduras, importante para a ação de várias enzimas, como a álcool desidrogenase e superóxido dismutase, também pode servir de ponte entre os resíduos de iso- α -ácidos dentro dos complexos com polipeptídios anfipáticos (moléculas que apresentam uma região hidrofílica e outra hidrofóbica) que ocorrem nas bolhas de espuma (14).

Já o Fe e o Cu juntamente com as substâncias encontradas no lúpulo podem formar complexos surfactantes que estabilizam a espuma da cerveja. Muitos cervejeiros adicionam pequenas quantidades desses elementos para o controle do aroma durante a fermentação. Também podem participar das reações de oxidação e redução, que acabam deteriorando o sabor da cerveja (14).

Os metais estão presentes no meio ambiente por causas naturais, além das atividades como mineração, fundições, incineração e depósitos de resíduos, que propiciam ainda mais o seu contato. Além disso, o aumento da utilização de fertilizantes e pesticidas podem também levar a um acréscimo na concentração de metais no solo e plantas, sendo esse acúmulo problemático devido os grandes riscos

à saúde humana causada por alguns elementos químicos (33,34), por outro lado, o Cu, Na, K, Ca Mn e Zn são essenciais para os processos fisiológicos, tendo em vista que certas enzimas necessitam de íons para a sua atividade catalítica (33).

2.7. Espectrometria de Absorção Atômica

A AAS é uma técnica analítica que se baseia na capacidade de átomos no estado fundamental absorverem energia a partir de uma fonte de radiação característica para cada elemento. Esta técnica já está consolidada e empregada para cerca de 70 elementos, para uma ampla gama de amostras na forma sólida, líquida e gasosa, dependendo do atomizador utilizado para cada determinação nos mais variados tipos de amostras, como chama, forno de grafite ou célula de quartzo (35,36).

2.7.1. Espectrometria de Absorção/Emissão Atômica por Chama

A F AAS/F AES são técnicas simples, robusta, seletiva e com capacidade de distinguir diferentes elementos químicos em amostras complexas, com custos de aquisição e manutenção acessíveis. A amostra líquida é introduzida no atomizador por meio de uma câmara de nebulização que converte o líquido em um aerossol, sendo misturado com o gás comburente e oxidante antes de atingir o queimador (35). O princípio da técnica de F AAS baseia-se na medida da absorção da radiação eletromagnética, proveniente de uma fonte de radiação, por átomos gasosos no estado fundamental, enquanto que para F AES baseia-se na medida de emissão de radiação eletromagnética por átomos excitados pela chama. O processo de formação de átomos gasosos no estado fundamental, denominado atomização, pode ser obtido via chama, via eletrotérmica, ou por reação química específica, como a geração de vapor frio de Hg. A Espectrometria de Absorção em Chama (F AAS) é a mais utilizada para análises elementares em níveis de mg L^{-1} (36). Um único instrumento pode operar com uma das duas técnicas de espectrometria atômica, basta o operador selecionar o tipo de análise que será realizada, F AAS ou F AES.

2.7.2. Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por micro-ondas (MIP OES)

O espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas utiliza o plasma de nitrogênio, o qual é gerado por uma energia de micro-ondas magneticamente acoplada. O uso de uma fonte de gás separado se torna desnecessária, uma vez que um gerador de nitrogênio e um compressor de ar simples são suficientes para rodar o plasma (37).

São encontrados estudos na literatura com determinações de metais utilizando o MIP OES, tais como Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni e Pb em amostra de couro (38), Cr, Ni, Pb e V em amostras de gasolina e etanol (39), B em amostras de vinho turco (40), Cu, Mn, Zi, e Fe em amostras de carne e fertilizantes (41) e a uma grande tendência de essa técnica se despontar como uma das mais utilizadas para análise de rotina entre as técnicas de espectrometria atômica, não só pela sua simplicidade operacional, mas em função principalmente da sua relação custo/benefício.

2.8. Determinação de minerais em cerveja

A quantificação de metais em amostras de cerveja geralmente é realizada através das técnicas de Espectrometria de Absorção Atômica com Chama (F AAS) (8,42,43), Espectrometria de Absorção Atômica com Chama e Forno Tubular com *Termo Spray* (TS-FF AAS) (44), Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF AAS) (45), Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) (46,47,48), e Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) (49,50). Além das técnicas citadas acima, a Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-ondas (MIP OES) é uma nova e interessante alternativa, não só por apresentar características de análise multielementar, o que diminui o tempo da análise e consumo de amostra, mas também por utilizar um plasma de nitrogênio, que é proveniente de gerador alimentado por ar comprimido, diminuindo assim significativamente os custos das análises.

Para a determinação de metais por técnicas de espectrometria atômica onde se utiliza a introdução da amostra no equipamento por sistema de nebulização, se faz necessário que a amostra esteja em solução. O uso da decomposição ácida em sistemas abertos utilizando blocos digestores (47,48,51) e sistemas fechados em

fornos de micro-ondas (43,50) é amplamente utilizado para esta finalidade, no entanto em sistemas abertos, existe a possibilidade de ocorrer perdas por volatilização dos analitos e reagentes, enquanto que em sistemas fechados, se faz necessário utilizar volumes menores de amostra para não comprometer a segurança de trabalho, o que prejudicaria os limites de quantificação dos métodos.

Uma alternativa de preparo de amostras para a determinação de metais é o uso de um sistema de refluxo nas decomposições em copo aberto, no intuito de evitar perdas por volatilização, pois durante o processo de condensação no dedo frio, a solução formada retém as espécies volatilizadas, e durante o processo de gotejamento, os voláteis retornam ao meio reacional. Diversas aplicações com esse sistema podem ser encontradas na literatura (52,53,54).

O preparo da amostra é uma etapa crucial, visto que nesta etapa deposita-se maior atenção e tempo, além de ser na maioria das vezes a etapa que gera os maiores gastos e erros. O ideal é que a determinação dos elementos seja feita diretamente no local de amostragem, através da análise direta sem tratamentos prévios, pois há uma diminuição das etapas na sequência analítica, tornando os métodos mais simples. No entanto, é limitado o número de equipamentos que podem ser levados ao campo para a determinação de todas as espécies químicas em qualquer tipo de amostra. Devido a isto, é necessário que as amostras sejam submetidas ao tratamento adequado em laboratório para a determinação dos elementos de interesse (56).

Na Tabela 3 estão dispostos alguns métodos aplicados para o preparo de amostra de cerveja e determinação de metais. Em sua maioria observa-se a utilização da digestão ácida em sistema aberto para análise de metais como Pb e Cd, além do emprego da análise direta, a qual não há necessidades de preparo de amostra. A análise direta pode gerar, entretanto, efeito de matriz por se tratar de uma amostra complexa, como a cerveja, sendo necessário muitas vezes o uso de uma etapa de diluições para minimizar as interferências.

Tabela 3: Métodos analíticos utilizados no preparo de amostras de cervejas para determinação de metais

Analitos	Procedimentos	Volume de amostra	Técnica de análise aplicada	Referência
Al	Digestão ácida assistida por micro-ondas e digestão em sistema aberto com auxílio de catalisador de vanádio	5 mL	GF AAS	(55)
Co, Cr, Cu, Fe, Pb e Zn	Digestão ácida em sistema aberto	50 mL	ICP OES	(48)
Cd, Co, Cu, Pb e Zn	Banho de areia e extração líquido-líquido	-	F AAS	(56)
Cd, Co, Cu, Ni e Zn	Pré-concentração	200 mL	ICP OES	(46)
Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb e Zn	Digestão ácida em sistema aberto	10 mL	F AAS	(57)
Cu, Mn e Fe	Análise direta	-	ICP OES	(58)
Cu, Mn, Pb e Zn	Análise direta	-	TS FF AAS	(44)
Al, Cd, Cu e Pb	Análise direta	-	GF AAS	(59)
Al, Ca, Cr, Cu, Fe, Mn, Zn, Mg, Na, K, P e La	Análise direta	-	ICP OES	(60)
Zn, P, B, Mn, Fe, Mg, Al, Sr, Ca, Ba, Na e K	Digestão ácida em sistema aberto	50 mL	ICP OES	(47)

3. Materiais e Métodos

3.1. Instrumentação

As determinações monoelementares de Fe, Mg, Na e Zn foram realizadas em um espectrômetro de absorção atômica por chama Perkin Elmer AAnalyst 200 (Shelton, CT, EUA), equipado com lâmpada de deutério para correção do sinal de fundo e lâmpadas de cátodo oco Perkin Elmer (Shelton, CT, EUA) para cada analito. Os parâmetros instrumentais utilizados foram conforme as recomendações do fabricante. Foi utilizado a chama de ar/acetileno, com a pureza do gás oxidante de 99,7 % (Linde, São Paulo, Brasil) numa vazão de ar de 10,0 L min⁻¹, e acetileno de 2,37 L min⁻¹ para Na, e 2,75 L min⁻¹ para Zn, Mg e Fe. As vazões dos gases (ar e acetileno) foram otimizadas através de delineamento composto central rotacional (DCCR), 2² com 3 pontos centrais e 4 pontos axiais, considerando as seguintes variáveis independentes, vazão do ar (8 a 12 L min⁻¹) e vazão de acetileno (2 a 3,5 L min⁻¹) (Tabela 4).

Tabela 4: Variáveis independentes e respectivos níveis estudados no DCCR para otimização da vazão dos gases no F AAS.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Vazão de ar (L min ⁻¹)	8	9	10	11	12
Vazão de acetileno (L min ⁻¹)	2	2,37	2,75	3,12	3,5

As determinações multielementares de Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn foram realizadas utilizando um espectrômetro de emissão óptica com plasma induzido por micro-ondas MP AES 4200 da Agilent Technologies (Melbourne, Austrália), equipado com um nebulizador e uma câmara de pulverização ciclônica de vidro dupla passagem. Nitrogênio foi extraído do ar utilizando um gerador de nitrogênio 4107 (Agilent Technologies, Melbourne, Austrália). O alinhamento da tocha e calibração do comprimento de onda de cada elemento foi realizado utilizando uma solução de calibração em meio de HNO₃ semelhante às amostras e otimizados automaticamente pelo instrumento com o MP Expert Software (versão 1.5.1.0, Agilent Technologies, Melbourne, Austrália). As condições operacionais utilizadas estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros de instrumentais para determinações por MIP OES.

Elementos	Comprimento de onda (nm)	Posição	Fluxo de gás de nebulização (L/min)
Ca	393,366	10	0,60
Fe	371,933	0	0,75
K	766,491	10	1,00
Mg	285,213	10	0,70
Mn	403,076	0	0,90
Na	588,995	0	1,00
Ni	352,454	0	0,70
Zn	213,875	0	0,55

Para a decomposição da amostra foi utilizado um bloco digestor convencional (modelo MA-4025, Marconi, Brasil) utilizando tubos digestores acoplados a um sistema de refluxo com recirculação de água a 15 °C proveniente de um banho termostatizado (modelo Q-214M2, Quimis, São Paulo, SP, Brasil), conforme desenvolvido por Oreste *et al.* (61). A desgaseificação da amostra foi realizada utilizando banho ultrassônico (40 (H) S Elmasonic, Elma, Singen, Alemanha).

3.2. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico. Para o preparo das soluções, utilizou-se água desionizada obtida a partir da destilação em um destilador fabricado em vidro (MA078/5, Marconi, SP) e posteriormente eluída em um desionizador (CS1800 Evolution, Permution, PR). Soluções de trabalho para e Mg e Na foram preparadas por diluições feitas a partir de uma solução estoque para AAS contendo 1000 mg L⁻¹ (Fluka, Buchs, Suíça). Para Zn e Fe, as soluções de trabalho foram obtidas de forma semelhante, a partir de soluções estoque que foram preparadas a uma concentração de 1000 mg L⁻¹ de Tritisol® (Merck, Darmstadt, Alemanha) em água desionizada. Para Ni, Mn, Ca e K foi utilizado a solução de padrão multielementar para ICP, 100 mg L⁻¹ (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA). Na etapa de preparo das amostras foi utilizado

HNO₃ 65 % v/v (Synth, Diadema, Brasil) bidestilado abaixo do seu ponto de ebulição em um destilador de quartzo MA-075 (Marconi, Piracicaba, Brasil) e H₂O₂ 30% v/v (Merck, Darmstadt, Germany). Toda a vidraria e materiais de laboratório foram descontaminados por imersão em solução de HNO₃ a 10 % v/v por, pelo menos, 24 h, sendo posteriormente lavados com água desionizada e secos a temperatura ambiente antes de seu uso.

3.3. Amostras

Um total de 23 amostras de cerveja tipo *porter*, *lager*, *pale ale* e *weiss* foram adquiridas em mercado local (Pelotas-RS, Brasil), sendo seu conteúdo homogeneizado e desgaseificado em banho ultrassônico por 15 min antes dos experimentos e armazenado a -18 °C. Para o desenvolvimento do método, foi utilizada uma cerveja tipo *Porter* (amostra 1) e além destas, outras 3 amostras de cervejas do tipo *lager* (amostra 2), *pale ale* (amostra 3) e *weiss* (amostra 4) foram utilizadas para verificar a exatidão do método pelas técnicas de F AAS e F AES, através de ensaios de adição e recuperação. Para as determinações multielementares pela técnica de MIP OES novos lotes das mesmas amostras foram empregados, recebendo a numeração de 5 a 8. Posteriormente à checagem da exatidão, o método foi aplicado na determinação de Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn em outras 15 amostras de cerveja por MIP OES. Foi realizado também estudos comparativos entre as diferentes técnicas avaliadas para a determinações de Na, Mg, Fe e Zn nessas amostras de cerveja.

3.4. Preparo da amostra

Para o preparo das amostras, foi utilizada a decomposição ácida em copo aberto no bloco digestor, sendo que em cada tubo reacional foi introduzido um dedo frio, o que permite operar a etapa de aquecimento do bloco em temperaturas superiores ao ponto de ebulição dos ácidos. Esse procedimento de decomposição com sistema de refluxo (Figura 2) além de permitir o aquecimento em elevadas temperaturas, propicia também numa maior eficiência de transferência de calor e aumento na turbulência no meio reacional, fazendo com que a digestão se torne mais rápida e eficiente (61).

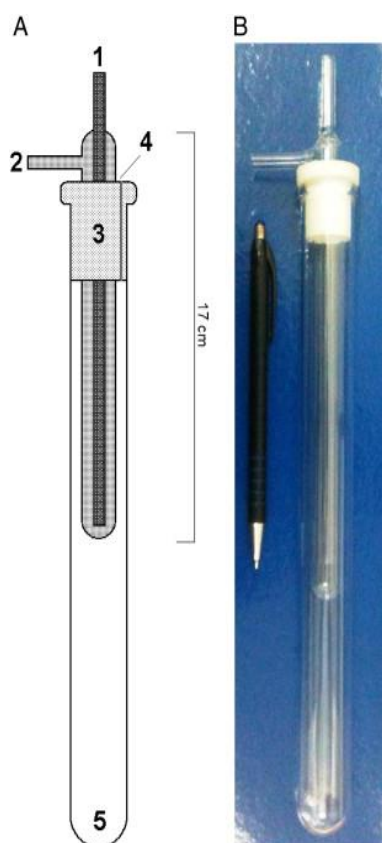


Figura 2: A) Esquema do dedo frio acoplado ao tubo digestor de vidro. 1 - entrada de água; 2 - saída de água; 3 - tampão de extremidade de PTFE; 4 - saída de gás; 5 - balão de reação. B) imagens de sistema do dedo frio (61).

O uso do sistema de refluxo é uma alternativa às decomposições em sistema aberto, o qual evita as perdas por volatilização, pois durante o processo de condensação no dedo frio, a solução formada retém as espécies volatilizadas e durante o processo de gotejamento retorna ao meio reacional. Diversas aplicações recentes podem ser encontradas na literatura para diferentes (52,53,54,61).

O procedimento de digestão foi otimizado através de um planejamento estatístico e foi aplicado para todas as amostras, conforme segue: 10,0 mL da amostra desgaseificada e 5,0 mL de HNO_3 foram adicionados no tubo digestor com auxílio de micropipetas, seguido de uma etapa de aquecimento com o bloco digestor a 160 °C por 75 min. Posteriormente a um breve resfriamento, foram adicionados 2,0 mL de H_2O_2 e novamente aquecido por mais 18 min para a completa mineralização, obtendo por fim uma solução resultante que foi quantitativamente transferida e avolumada a 25,0 mL com água desionizada.

Para o desenvolvimento deste procedimento, foi empregado um delineamento composto central rotacional (DCCR), 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais, considerando as seguintes variáveis independentes: volume de amostra (de 2,5 a 10 mL), temperatura do bloco digestor (de 120 a 160 °C) e tempo de decomposição (de 30 a 120 min) (Tabela 6).

Tabela 6: Variáveis independentes e respectivos níveis estudados no DCCR para otimização da decomposição da amostra.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Volume de Amostra (mL)	2,5	4,4	6,30	8,2	10
Temperatura (°C)	120	130	140	150	160
Tempo (min.)	30	48	75	101	120

Os ensaios foram realizados em triplicata e de forma aleatória de acordo com a ordem das análises arranjadas pelo software Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA), considerando o nível de significância de 90 %, sendo as variáveis dependentes os sinais analíticos para os elementos Zn, Mg e Na. Os volumes de amostra foram normalizados para 1,0 mg L⁻¹, a fim de evitar interferências dos resultados. Para verificação da exatidão do método foram realizados ensaios de recuperação com 3 valores de concentração intermediários à curva de calibração para cada elemento investigado.

3.5. Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito avaliados incluem linearidade, precisão, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) (62). As curvas de calibração foram preparadas no mesmo meio ácido utilizado no preparo das amostras. Análise de variância (ANOVA) e teste T pareado ao nível de 90 % de significância foram utilizados para comparação entre as metodologias empregadas. Para a obtenção dos valores dos limites de detecção e quantificação do método, foram analisados os brancos analíticos para cada elemento. O Limite de Detecção (LD) corresponde a quantidade mínima que é possível ser detectada de um analito, isto é, é a menor concentração do analito que pode ser detectada com

segurança, diferenciando-se do branco analítico. Este parâmetro é calculado conforme a Equação 1.

$$LD = 3 \sigma / a$$

Equação 1

Onde:

σ é o desvio padrão de dez medidas de sinais analíticos do branco;

a é o coeficiente angular da curva de calibração.

O Limite de Quantificação (LQ) é conhecido como a menor concentração de um analito que pode ser quantificada com um erro menor que 5%. Este parâmetro é calculado de acordo com a Equação 2.

$$LQ = 10 \sigma / a$$

Equação 2

Onde:

σ é o desvio padrão de dez medidas de sinais analíticos do branco;

a é o coeficiente angular da curva da curva de calibração.

3.6. Aplicação do método

Após o desenvolvimento do procedimento de preparo das amostras de cerveja, o método de decomposição com o sistema de refluxo foi aplicado para 23 amostras de cervejas industrializadas e artesanais na determinação de Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn por MIP OES.

4. Resultados e discussões

4.1. Otimização das vazões dos gases

A combinação de ar e acetileno para a chama do F AAS e F AES utiliza temperaturas relativamente inferiores (~ 2300 °C) quando comparado com outros gases como a mistura com óxido nitroso e acetileno (~ 3000 °C), sendo que o ajuste na proporção desses gases gera melhores resultados analíticos em função da mistura ser mais oxidante ou redutora. No entanto, a chama com óxido nitroso, expõe o equipamento e as conexões a altas temperaturas, ocasionando

um maior desgaste dos mesmos, além do comburente apresentar um custo elevado frente ao ar comprimido (35)

Nessa etapa de otimização buscou-se obter parâmetros instrumentais que viabilizassem sinais analíticos intensos para a chama que usa o ar comprimido como oxidante. Para estabelecimento dos parâmetros de vazão, utilizou-se solução de amostra já digerida e otimizada anteriormente além de soluções dos padrões inorgânicos de Na, Mg, Fe e Zn. Na Tabela 7 são apresentados os resultados obtidos pelo DCCR para a otimização da vazão dos gases no F AAS.

Tabela 7: Matriz com combinações e respostas experimentais do DCCR para a vazões da chama ar-acetileno.

Variáveis independentes			Variáveis dependentes			
Ensaio	Vazão de ar (L min ⁻¹)	Vazão de acetileno (L min ⁻¹)	Fe	Mg	Na	Zn
1	9	2,00	0,0077	52,1333	359400	0,0957
2	11	2,00	0,0073	46,8000	335333	0,0863
3	9	3,12	0,0047	34,1667	267733	0,0650
4	11	3,12	0,0037	38,3667	306767	0,0753
5	8	2,75	0,0043	42,4000	315400	0,0857
6	12	2,75	0,0060	44,1000	318433	0,0877
7	10	2,00	0,0037	24,5000	254467	0,0897
8	10	3,50	0,0013	24,2667	195067	0,0297
9 (C)	10	2,75	0,0037	46,2333	328133	0,1227
10(C)	10	2,75	0,0037	46,3333	330067	0,1170
11(C)	10	2,75	0,0043	45,9000	328667	0,1247

De acordo com os diagramas de Pareto, para o Mg (Figura 3A) e Na (Figura 3B) apenas a vazão do acetileno foi estatisticamente significativa, sendo que para Zn (Figura 3C) todos os parâmetros estudados foram significativos. O Fe (Figura 3D) não apresentou variável significativa.

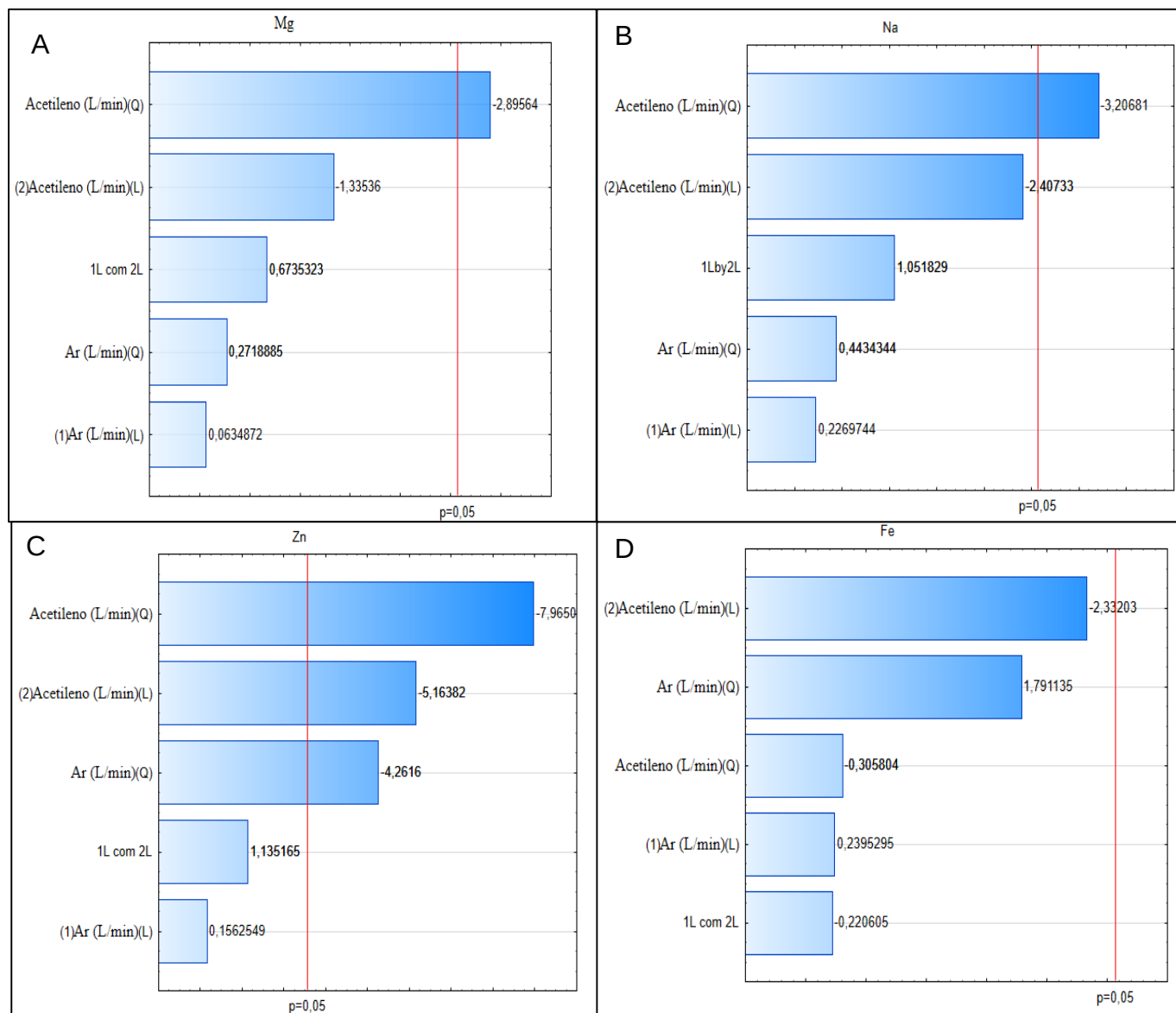


Figura 3: Diagrama de Pareto a 95% de confiança para Mg (A), Na (B), Zn (C) e Fe (D).

Como pode ser observado na Figura 4, os valores centrais para Zn e Mg apresentam maior sinal analítico. Assim, foram utilizadas as seguintes condições: vazão de ar de 10 L min⁻¹ para todos os analitos, sendo a vazão de acetileno de 2,37 L min⁻¹ para Na e 2,75 L min⁻¹ para Zn, Mg e Fe.

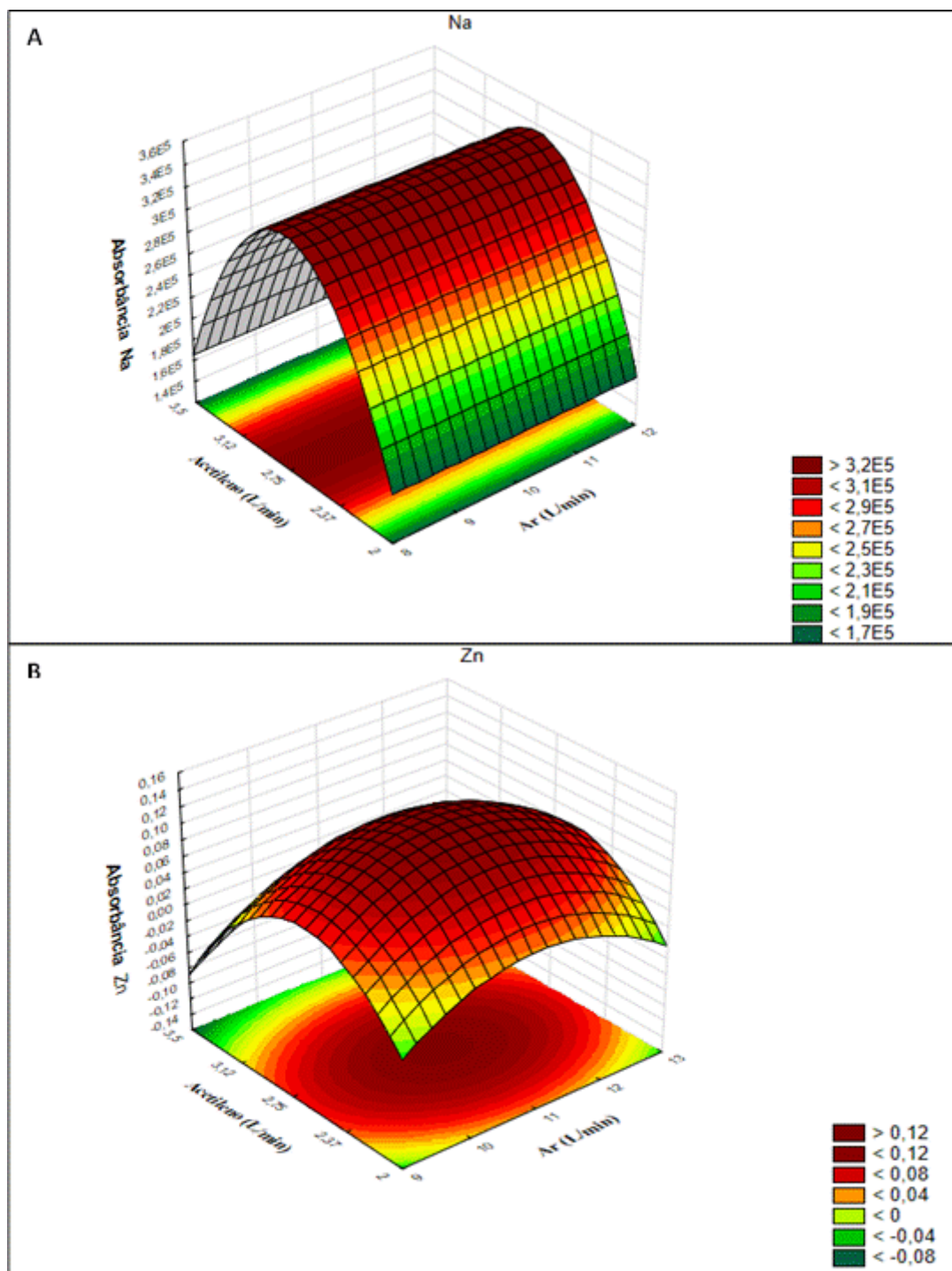


Figura 4: Gráficos de superfície de respostas, em A (Zn), B (Mg) para a otimização das vazões dos gases em função de acetileno (L min⁻¹) e ar (L min⁻¹).

4.2. Otimização da decomposição com HNO₃ em sistema de refluxo

A partir das respostas para Na, Mg e Zn obtidas pelo DCCR (Tabela 8) via F AES/F AAS, foi possível avaliar quais parâmetros apresentaram-se estatisticamente significativos no método de preparo de amostra em meio de HNO₃ com sistema de refluxo, os quais são apresentados nos diagramas de Pareto para cada analito (Figura 5).

Tabela 8: Matriz com combinações e respostas experimentais do DCCR para a decomposição da amostra.

Variáveis independentes				Variáveis dependentes		
Ensaio	Volume de amostra (mL)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Mg	Na	Zn
1	4,4	130	48	0,4180	5729	0,8567
2	8,2	130	48	0,2361	3941	0,8390
3	4,4	150	48	0,4136	5781	0,8347
4	8,2	150	48	0,2341	3885	0,8310
5	4,4	130	130	0,4179	5636	0,8143
6	8,2	130	130	0,2335	3788	1,2590
7	4,4	150	130	0,4120	5749	0,8143
8	8,2	150	130	0,2352	3962	1,2580
9	2,5	130	75	0,3905	4839	0,8067
10	10,0	130	75	0,1951	3471	0,8807
11	6,30	120	75	0,7529	11640	1,2757
12	6,30	160	75	0,2956	4491	1,2653
13	6,30	140	30	0,2973	4459	0,8067
14	6,30	140	120	0,2952	4477	0,8790
15 (C)	6,30	140	75	0,2985	4587	0,8623
16(C)	6,30	140	75	0,2989	4655	0,8617
17(C)	6,30	140	75	0,2993	4620	0,8683

Nos diagramas obtidos, observou-se que para Zn (Figura 5A) apenas a temperatura foi estatisticamente significativa, e para Mg, apenas o volume da amostra (Figura 5B). Já para Na (Figura 5C) nenhuma das variáveis se mostrou

significativa. Assim, foram geradas as superfícies de resposta para esses três elementos, apresentadas na (Figura 6).

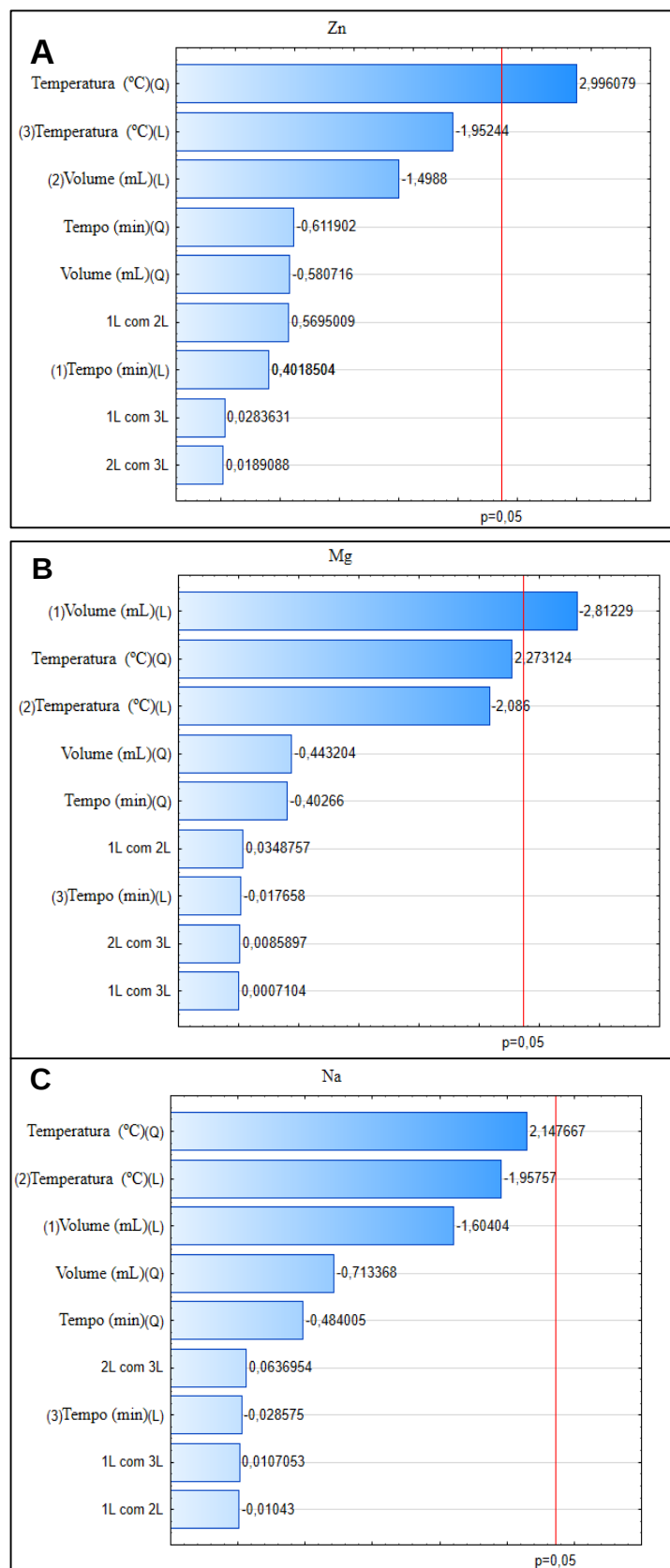


Figura 5: Diagrama de Pareto a 95 % de confiança para Zn (A), Na (B) e Mg (C).

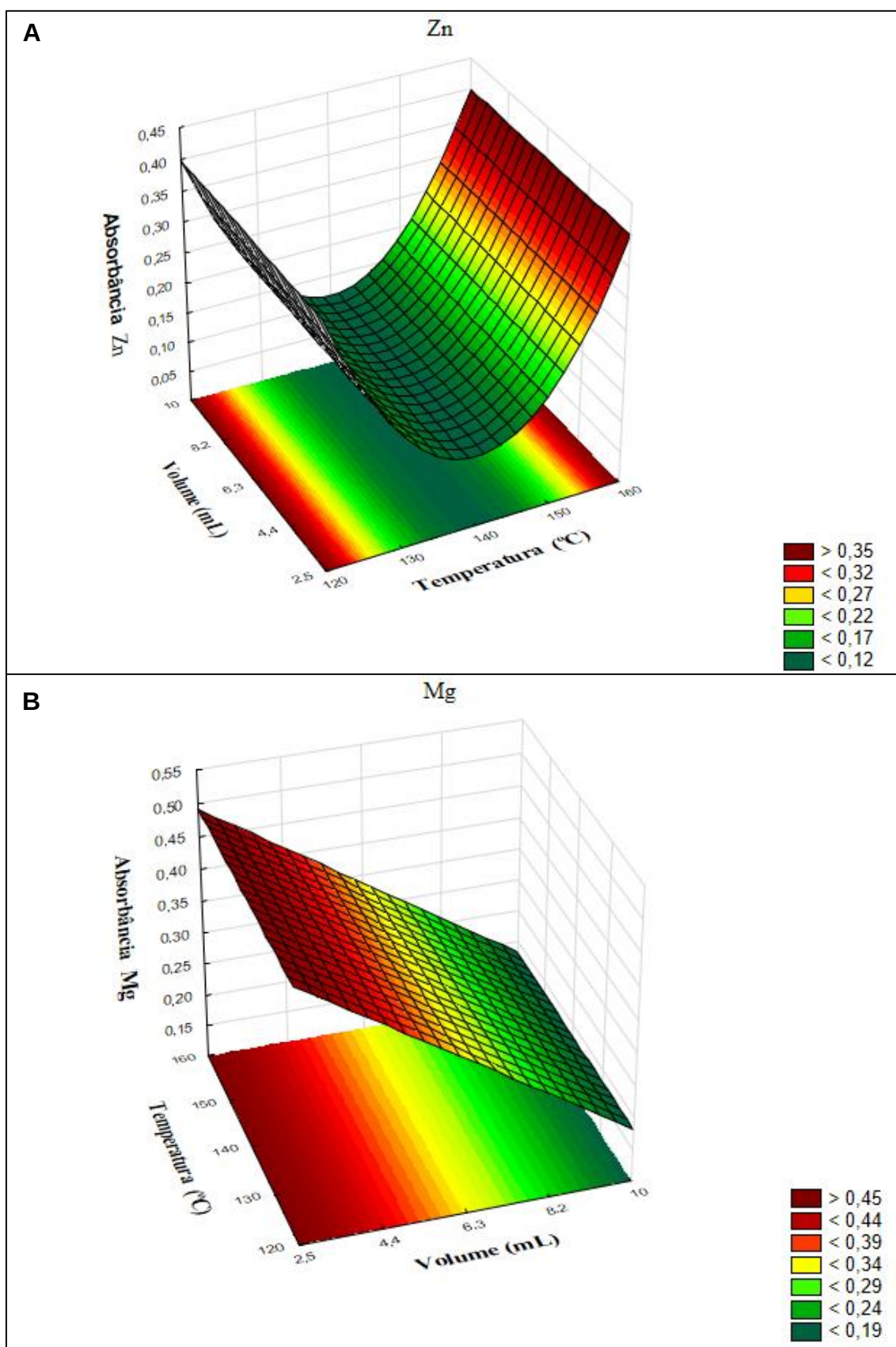


Figura 6: Gráficos de superfície de respostas: (A) relação entre volume (mL) x temperatura (°C) para Zn (B) relação entre temperatura (°C) x volume (mL) para Mg.

Alguns autores relatam o uso de maiores volumes de amostra, variando de 10 a 50 mL na abertura das amostras para determinação dos minerais e contaminantes em cerveja (8,43,47). Neste estudo os resultados estatísticos mostraram que para Zn, (Figura 6A), os valores de volume estudados não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Entretanto, para Mg (figura 6B) os valores inferiores ao ponto central foram os que originaram resultados satisfatórios. Portanto foi escolhido um volume de amostra alto, pois mostrou ser mais eficiente para ambos analitos.

O uso da temperatura um pouco acima do ponto de ebulição do ácido nítrico para decomposição da amostra é relatado na literatura em muitos estudos (55,63,64). Na Figura 6A, observa-se que para o Zn, as temperaturas abaixo de 130 °C e acima de 150 °C geram resultados satisfatórios. Contudo, foi escolhido o maior valor de temperatura (160 °C) para permitir com melhor eficiência o rompimento de ligações entre os elementos e peptídeos na cerveja, que atuam na formação da espuma (11). Além dos benefícios já comentados anteriormente como uma melhor eficiência na transferência de calor e aumento na turbulência do meio reacional, torna o processo mais eficiente em um tempo menor para o preparo das amostras de cerveja.

Para períodos mais longos de decomposição, foi observada a formação de material em suspensão, que pode causar entupimento do sistema de nebulização dos equipamentos, impedindo a determinação por F AAS / F AES e MIP OES. Para evitar este problema durante as medições instrumentais foi escolhido um tempo intermediário (93 minutos).

A fim de padronizar o método de decomposição, foram utilizados os seguintes parâmetros no preparo das amostras de cerveja: 10,0 mL de amostra, 5,0 mL de HNO₃, 160 °C a temperatura do bloco digestor, 93 min de aquecimento, sendo que 18 min desse tempo foi após a adição de 2,0 mL de H₂O₂. A condição otimizada foi realizada em triplicata e ensaios de recuperação foram realizados para avaliar exatidão e precisão das análises. Além da cerveja *Porter* (amostra 3), utilizada no desenvolvimento do método, os ensaios de recuperação foram realizados também em cerveja *pale ale*, *Lager* e *Weiss* (amostras 1, 2 e 4, respectivamente), os quais estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Concentrações, antes e após as adições de, Fe, Mg e Zn nas amostras de cervejas (n=3) do tipo pale ale (1), Lager (2), Pilsner (3) e Weiss (4).

Elemento	Técnica	Valor adicionado, (mg L ⁻¹)	Valor encontrado, mg L ⁻¹ ± SD (RSD, %)			
			1	2	3	4
Fe	F AAS	0	0,100 ± 0,004 (4,0)	0,18 ± 0,01 (5,6)	0,36 ± 0,01 (2,8)	0,54 ± 0,02 (3,7)
		0,5	0,580 ± 0,010 (1,7)	0,62 ± 0,01 (1,6)	0,84 ± 0,01 (1,2)	0,95 ± 0,03 (3,2)
		0,75	0,740 ± 0,010 (1,4)	0,82 ± 0,02 (2,4)	1,25 ± 0,07 (5,6)	1,28 ± 0,04 (3,1)
		1,25	1,110 ± 0,010 (0,9)	1,23 ± 0,05 (4,1)	1,45 ± 0,02 (1,4)	2,03 ± 0,03 (1,5)
Mg	F AAS	0	59,5 ± 1,6 (2,7)	71,8 ± 2,8 (3,9)	145,1 ± 6,8 (4,7)	59,7 ± 4,6 (7,7)
		0,65	60,1 ± 2,5 (4,1)	72,4 ± 2,5 (3,4)	145,8 ± 3,0 (2,0)	60,4 ± 0,8 (1,3)
		0,9	60,5 ± 3,4 (5,6)	72,6 ± 4,6 (6,3)	146,1 ± 5,5 (3,8)	60,5 ± 2,0 (3,3)
		1,4	61,1 ± 1,3 (2,1)	73,1 ± 0,7 (0,9)	146,6 ± 8,2 (5,6)	61,0 ± 0,3 (0,5)
Na	F AES	0	44,1 ± 2,6 (5,9)	40,3 ± 2,1 (5,2)	59,7 ± 3,5 (5,9)	57,3 ± 2,5 (4,3)
		1	45,2 ± 1,9 (4,2)	41,5 ± 0,6 (1,4)	60,5 ± 2,4 (4,0)	58,2 ± 4,2 (7,2)
		2	46,4 ± 3,5 (7,8)	42,1 ± 3,5 (8,3)	61,9 ± 1,3 (2,1)	59,0 ± 5,9 (10)
		4,5	48,0 ± 2,4 (5,0)	45,6 ± 3,9 (8,5)	64,4 ± 2,8 (4,3)	61,9 ± 1,9 (3,1)
Zn	F AAS	0	0,026 ± 0,002 (7,7)	0,061 ± 0,002 (3,3)	< LD	0,39 ± 0,01 (2,6)
		1	1,220 ± 0,014 (1,1)	1,131 ± 0,076 (6,7)	1,15 ± 0,05 (4,3)	1,55 ± 0,07 (4,5)
		1,5	1,463 ± 0,007 (0,5)	1,733 ± 0,118 (6,8)	1,69 ± 0,09 (5,3)	2,11 ± 0,15 (7,2)
		2,5	2,875 ± 0,035 (1,2)	2,550 ± 0,014 (0,5)	2,72 ± 0,01 (0,3)	3,16 ± 0,21 (6,5)

Os valores obtidos pelo teste de recuperação variaram entre 80 a 120% para todos os analitos, apresentando uma média de recuperação de 99 e 101% nas técnicas de F AAS e F AES, respectivamente, mostrando que o procedimento de preparo de amostra pode ser aplicado com segurança nas diferentes técnicas de espectrometria atômica, pois forneceu resultados exatos e precisos, com um RSD médio de 3,2%.

4.3. Estudo comparativo entre metodologias utilizadas

Posteriormente ao desenvolvimento, a condição otimizada também foi avaliada para a determinação de Ca, K, Mn e Ni por MIP OES e os valores obtidos pelo teste de adição e recuperação, variaram entre 97, 102, 106 e 101%, respectivamente (Tabela 10).

Tabela 10: Valores recuperados na amostra da cerveja do tipo porter (amostra 3) para n=3, na técnica MIP OES para decomposição ácida com sistema de refluxo.

Analitos	Adições (mg L ⁻¹)	Recuperado, $\bar{X} \pm SD$, mg L ⁻¹ (RSD, %)	Analitos	Adições (mg L ⁻¹)	Recuperado, $\bar{X} \pm SD$, mg L ⁻¹ (RSD, %)
Ni	0	0,13 $\pm$ 0,01 (4,33)	Mn	0	0,12 $\pm$ 0,01 (4,95)
	1,5	1,72 $\pm$ 0,01 (0,34)		1,5	1,87 $\pm$ 0,01 (0,31)
	7,5	7,61 $\pm$ 0,35 (4,65)		7,5	8,20 $\pm$ 0,42 (5,17)
	10	8,94 $\pm$ 0,45 (5,06)		10	9,75 $\pm$ 0,49 (4,98)
Ca	0	43,27 $\pm$ 1,45 (3,34)	K	0	397,77 $\pm$ 27,78 (6,98)
	1,5	44,72 $\pm$ 0,30 (0,68)		1,5	399,04 $\pm$ 1,36 (0,34)
	7,5	50,22 $\pm$ 1,94 (0,34)		7,5	406,23 $\pm$ 32,18 (7,92)
	10	55,10 $\pm$ 0,13 (7,92)		10	408,67 $\pm$ 4,18 (1,02)

Em estudo comparativo entre as análises mono e multielementar, que está apresentada na Tabela 11 para a determinação de Na, Fe, Mg e Zn, o teste T pareado mostrou que a 90% de confiança, não há diferenças significativas entre a instrumentação utilizada para determinação dos analitos, seja por F AAS, F AES ou MIP OES. Portanto, o método de decomposição desenvolvido pode ser utilizado para análises em ambos os equipamentos, e em todas as situações

o valor de T calculado foi abaixo de 0,76, enquanto que o valor Tabelado é de 3,078. As amostras 6, 7 e 8 apresentaram valores maiores de Zn ao ser comparados com o estipulado pela lei vigente do Mercosul.

Tabela 11: Valores encontrados para Na, Mg, Fe, Zn, em 4 amostras de cervejas (Pale ale, Lager, Porter, Weiss) analisadas por MIP OES e F AAS/F AES (n = 3)

X ± SD, mg L ⁻¹ (RSD, %)				
Amostra	F AAS/F AES	MIP OES	F AAS	MIP OES
Fe		Mg		
5	0,177 ± 0,004 (2,2)	0,173 ± 0,006 (3,5)	78,75 ± 2,14 (2,7)	77,47 ± 1,13 (1,4)
6	0,113 ± 0,004 (3,5)	0,100 ± 0,001 (1,0)	63,20 ± 0,69 (1,1)	61,51 ± 0,35 (0,6)
7	0,273 ± 0,003 (1,1)	0,275 ± 0,001 (0,4)	89,47 ± 3,35 (3,7)	90,52 ± 0,85 (0,1)
8	0,111 ± 0,008 (7,2)	0,100 ± 0,001 (1,0)	82,53 ± 1,10 (1,30)	83,02 ± 0,04 (0,05)
Na		Zn		
5	61,25 ± 0,56 (0,9)	58,52 ± 0,97 (1,6)	0,764 ± 0,009 (1,2)	0,760 ± 0,010 (1,3)
6	25,55 ± 0,61 (2,4)	26,79 ± 0,52 (1,7)	0,994 ± 0,022 (2,2)	1,030 ± 0,010 (1,0)
7	41,80 ± 0,92 (2,2)	42,07 ± 0,15 (0,3)	1,200 ± 0,017 (1,4)	1,143 ± 0,012 (1,0)
8	38,17 ± 1,23 (3,2)	39,27 ± 0,63 (1,6)	0,857 ± 0,008 (0,9)	0,867 ± 0,014 (1,6)

4.4. Resultados analíticos: Parâmetros de mérito

Os parâmetros de mérito para as curvas de calibração dos analitos estudados estão apresentados na Tabela 12. Os limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) obtidos para o método proposto ficaram abaixo dos valores estipulados pela ANVISA para determinação de Zn e Ni, que são de 1 e 0,1 mg L⁻¹, respectivamente (21). Para os demais analitos estudados não existem limites máximos na legislação brasileira. Além disso, observa-se que as determinações dos elementos por MIP OES foi mais sensível frente às técnicas mono elementar para alguns analitos, apresentando melhores coeficientes angulares das curvas de calibração (aumento de sensibilidade), que aliado a uma melhora na precisão das determinações (menor desvio padrão), forneceu os melhores LD's e LQ's, e R² com valores de 0,999 para quase todos os analitos, com exceção para o ferro que foi de 0,996. O método de preparo de amostra de cerveja apresentou

algumas vantagens quando comparado com os já existentes na literatura, como por exemplo, apresentou LD's e LQ's adequados para o volume de amostra utilizado, ao contrário de Bellido-Milla *et al.* (2000) (43), que necessitou de 23 mL de amostra para o preparo, e de Matsushige *et al.* (1993) (48), que utilizou cerca de 50 mL de amostra em sistema aberto por 4 h de aquecimento antes das análises por ICP OES.

Tabela 12: Parâmetros analíticos para determinação de Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Zn, por MIP OES, F AAS e FAES.

Elemento	Técnica	a (L mg ⁻¹)	R ²	Faixa linear (mg L ⁻¹)	Instrumental		Método	
					LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)
Ca	MIP OES	605804	0,999	0,5 – 5,0	0,003	0,008	0,007	0,020
Fe	F AAS	0,0827	0,995	0,15 – 0,75	0,010	0,040	0,025	0,100
	MIP OES	14886	0,996		0,005	0,020	0,010	0,050
K	MIP OES	123229	0,999	0,5 – 5,0	0,001	0,002	0,002	0,005
Mg	F AAS	1,1017	0,998	0,2 – 0,6	0,002	0,005	0,005	0,012
	MIP OES	321698	0,999		0,003	0,008	0,007	0,020
Mn	MIP OES	58827	0,999	0,5 – 5,0	0,0004	0,0010	0,0010	0,0030
Na	F AES	9445	0,995	0,1 – 2,0	0,001	0,003	0,003	0,007
	MIP OES	630543	0,999		0,001	0,002	0,002	0,005
Ni	MIP OES	29508	0,999	0,5 – 5,0	0,0004	0,0010	0,0010	0,0025
Zn	F AAS	0,4566	0,991	0,10 – 2,0	0,003	0,008	0,007	0,020
	MIP OES	20486	0,999		0,006	0,015	0,015	0,040

4.5. Aplicação das Otimizações na determinação dos metais

A Tabela 13 apresenta a aplicação da metodologia proposta na determinação multielementar de Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni e Zn por MIP OES em 15 amostras de cervejas de diferentes tipos e fabricantes. Os valores assemelham-se aos encontrados na literatura para Ni, Mn, K, Ca, Mg, Na, Fe e Zn (44,46,48,57,60). As cervejas dos estilos *weiss* (de trigo) e escuras são cervejas mais encorpadas que os outros estilos, muitas vezes não sendo filtradas no processamento. Portanto, provavelmente é por esse motivo que apresentam, na maioria dos elementos estudados, os maiores teores encontrados para Mn, Na e Ni. Por outro lado, o estilo que apresenta os menores teores na maioria dos elementos é o *pilsen*. Possivelmente por ser uma cerveja mais límpida visualmente e com sabores mais suaves, pode levar em sua formulação menos matérias primas, como o lúpulo, o que certamente acarreta nos menores teores de alguns elementos. Algumas exceções ocorrem, como quando a *pilsen* apresenta maiores teores de Zn. O sódio pode ser proveniente de diversos meios, inclusive da água utilizada na fabricação. E por ser um elemento solúvel em água, mesmo sendo uma cerveja clarificada, o teor permanece na solução, fornecendo altos teores desse elemento. O potássio foi o elemento estudado que apresentou os maiores teores em todas as amostras. Sua origem na cerveja é proveniente do malte (32), o que está de acordo com outros estudos realizados (43,47,60).

O níquel foi um elemento que se encontrou em todas as cervejas em um teor médio de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Por ser um micronutriente essencial para as plantas (50), sua origem na cerveja pode estar relacionada ao lúpulo ou à cevada. O Zn apresenta baixos teores na cerveja (em torno de 1 mg L^{-1}). Embora seja um elemento importante para a fermentação pelas leveduras, altos teores poderiam influenciar negativamente na formação da espuma, assim como outros elementos como o Fe (10,11).

Das amostras avaliadas, apenas 2 cervejas apresentaram concentração de Ni acima do limite estabelecido pela legislação brasileira ($> 0,1 \text{ mg L}^{-1}$), e 10 amostras acima do limite para Zn ($> 1 \text{ mg L}^{-1}$) (22), dentre essas, por exemplo, as amostras 18 e 20, ambas cervejas escuras, apresentaram elevados teores de Ni e Zn. Verifica-se mais uma vez a importância de um método preciso e com

baixos limites de detecção e quantificação para determinação desses elementos, garantindo a qualidade e segurança dos produtos destinados ao consumo humano.

ANOVA e teste T pareado foram utilizados para determinar diferenças estatisticamente significativas entre médias das triplicatas. Entre a maioria das amostras de cervejas houve diferenças estatísticas a um $P < 0,05$, na maioria dos elementos. Isso pode ocorrer devido a diferentes matérias primas empregadas na fabricação, assim como a sua origem. Outro fator que contribui para essa diferença entre os valores das cervejas é a armazenagem passível de contaminações, tanto da matéria prima como do produto final. De maneira geral, não existe uma padronização na fabricação das cervejas artesanais assim como ocorre nas grandes indústrias. Assim, se faz necessárias análises constantes para evitar variações dos minerais e evitar possíveis contaminações.

Tabela 13: Valores encontrados em mg L⁻¹ para Na, Mg, Fe, Zn, Ni, Mn, Ca e K nas 15 amostras de cervejas analisadas por MIP OES.

Amostra		Ca	Fe	K	Mg	Mn	Na	Ni	Zn
<i>Pale ale</i>	11	9,57±0,02	0,213±0,006	445,2±11,4	75,33±1,71	0,117±0,006	45,47±2,03	0,077±0,006	1,060±0,057
	21	27,25±0,03	0,257±0,012	588,2±1,5	70,70±0,39	0,133±0,006	33,02±1,48	0,060±0,001	0,733±0,021
	23	20,93±0,23	0,113±0,006	636,0±7,3	69,34±1,75	0,263±0,006	91,61±3,55	0,070±0,001	0,675±0,007
<i>Lager</i>	10	20,59±0,42	0,170±0,001	437,3±4,3	59,39±2,75	0,130±0,001	27,85±1,61	0,067±0,006	1,030±0,001
	15	127,00±2,96	0,065±0,007	359,9±5,0	96,59±1,39	0,247±0,012	54,20±0,99	0,073±0,006	0,550±0,001
	17	47,59±0,21	0,080±0,001	446,1±1,6	80,05±0,76	0,073±0,006	36,27±0,21	0,080±0,001	1,280±0,028
Escuras	18	42,27±1,12	0,075±0,007	452,9±5,2	69,56±0,17	0,095±0,007	72,92±0,52	0,160±0,014	2,335±0,163
	19	27,39±0,25	0,080±0,001	567,2±7,0	91,30±0,66	0,110±0,001	41,72±0,32	0,095±0,007	1,143±0,012
	20	43,51±1,34	< LD	248,2±0,4	63,05±0,12	0,095±0,007	34,84±0,20	0,165±0,007	1,670±0,001
<i>Weiss</i>	9	20,89±0,08	0,185±0,007	284,1±4,7	63,28±1,88	0,240±0,010	60,82±3,42	0,093±0,006	0,760±0,014
	16	10,22±0,09	< LQ	499,7±17,8	79,95±2,82	0,217±0,006	39,57±1,32	0,093±0,006	1,243±0,031
	22	5,68±0,14	0,145±0,007	455,3±19,2	91,76±3,51	0,370±0,010	61,23±1,90	0,070±0,001	0,960±0,028
<i>Pilsen</i>	12	35,60±0,29	< LQ	245,6±3,4	45,65±1,06	0,060±0,001	68,01±2,06	0,067±0,006	1,825±0,205
	13	74,86±0,51	0,125±0,007	245,9±2,9	49,88±0,74	0,077±0,006	59,95±3,10	0,075±0,007	2,580±0,325
	14	50,34±1,96	< LQ	253,6±5,5	55,69±1,93	0,080±0,001	58,58±1,81	0,073±0,006	1,980±0,099

5. Conclusão

Esse trabalho mostrou a viabilidade do procedimento proposto de decomposição ácida em sistema “semifechado” com sistema de refluxo para as amostras de cerveja. O auxílio do planejamento estatístico propiciou a obtenção de resultados satisfatórios independente da técnica utilizada nas determinações. Os métodos desenvolvidos mostraram ser de fácil aplicação, práticos e de baixo custo quando comparados com métodos já existentes na literatura. Além disso, as amostras decompostas puderam ser avaliadas em diferentes equipamentos, evidenciando a eficiência e versatilidade do método de preparo das amostras. O uso do MIP OES possibilitou uma maior frequência analítica, pois permite uma análise multielementar, com menores LQ's, com excelente exatidão e precisão, reduzindo significativamente os custos das análises, já que necessita de pequena quantidade de amostra e não requer o uso de gases especiais.

Entre as amostras avaliadas, as cervejas do estilo *weiss* e as escuras foram as que apresentaram os maiores teores dos elementos, de maneira geral, sendo que a *pilsen* foi o estilo com os menores teores. Fica evidente a influência do estilo da de cerveja no teor dos elementos estudados.

Portanto, fica clara a importância de um método simples e eficaz para o monitoramento da cerveja quanto aos metais, já que os mesmos exercem importante papel nas características do produto, bem como no controle de qualidade, evitando contaminação e padronizando a produção.

6. Referências

- 1 KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 108-112, 2000.
- 2 AGU, R. C. Process Biochemistry. **Comparative Study of experimental beers Brewed from Millet, Sorghum and Barley Malts**, Nigeria, v. 30, n. 4, p. 311-315, 1995.
- 3 MARDEGAN, S. F. et al. Stable carbon isotopic composition of Brazilian beers—A comparison between large- and small-scale breweries. **Journal of Food Composition and Analysis**, Piracicaba, v. 29, n. 1, p. 52–57, 2013.
- 4 CERVEJA, A. B. D. I. D. **Anuário 2014**. São Paulo. 2014.
- 5 PATTERSON, M.; HOALST-PULLEN, N. **The Geography of Beer Regions, Environment, and Societies**. Dordrecht: Springer Science Business Media, 2014.
- 6 BAMFORTH, C. W. Nutritional aspects of beer—a review. **Nutrition Research**, Davis, v. 22, n. 2, p. 227-237, 2002.
- 7 FAO. **Vitamin and mineral requirements in human nutrition**. Genebra, p. 341. 2004.
- 8 POHL, P.; PRUSISZ, B. Fractionation analysis of manganese and zinc in beers by means of two sorbent column system and flame atomic absorption spectrometry. **Talanta**, Wroclaw, v. 71, n. 4, p. 1616-1623, 2007.
- 9 LI, Y.; VAN LOON, J. C.; BAREFOOT, R. R. Preconcentration of trace elements in potable liquids by means of a liquid membrane emulsion for flame atomic absorption determination. **Fresenius' Journal of Analytical Chemistry**, Changchun, v. 345, n. 6, p. 467-470, 1993.
- 10 POHL, P. Determination and fractionation of metals in beer: A review. **Food Additives and Contaminants**, Wroclaw, v. 25, n. 6, p. 693-703, 2008.
- 11 PALMER, J. J. **How to Brew: Everything You Need to Know to Brew Beer Right the First Time**. 3^a. ed. [S.l.]: Brewers Publications, 2006.
- 12 BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 3^a. ed. Berlin: Springer, v. I, 2009.
- 13 ZUFALL, C.; TYRELL, T. The Influence of Heavy Metal Ions on Beer Flavour Stability. **Journal of the Institute of Brewing**, Caracas, v. 114, n. 2, p. 134-142, 2008.

- 14 PIRES, E.; BRÁNYIK, T. **Biochemistry of Beer Fermentation**. 1º. ed. London: Springer Science Business Media, 2015.
- 15 CABRASA, ; HIGGINS,. Beer, brewing, and business history. **Business History**, Newcastle, v. 58, n. 5, p. 609-624, 2016.
- 16 LIMA, L. L. D. A.; FILHO, A. B. D. M. **Tecnologia de Bebidas**. Recife: CODAI, 2011.
- 17 AMBEV. NOTÍCIAS. Disponível em: <<http://www.ambev.com.br/noticias/>>. Acesso em: 07 julho 2016.
- 18 FILHO, W. G. V. **Tecnologia de Bebidas**. 1ª. ed. [S.l.]: Edgard Blücher, 2005.
- 19 VARNAM, A. H.; STHERLAND, J. P. **Bebidas, tecnologia, química e microbiologia**. [S.l.]: Acribia, 1997.
- 20 KIRIN. kirin Holdings. **Kirin Beer University Report Global Beer Production by Country in 2013**. Disponível em: <http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2014/0808_01.html>. Acesso em: 08 Novembro 2015.
- 21 ANVISA. **Consolidação da CP n. 69/2010 - Dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia para fabricação de fabricação de**. Brasília, p. 137. 2010.
- 22 ANVISA. **DECRETO Nº 55.871, DE 26 DE MARÇO DE 1965**. Brasília, p. 9. 1965.
- 23 MERCOSUL. **REGULAMENTO TÉCNICO MERCOSUL SOBRE LIMITES MÁXIMOS DE CONTAMINANTES INORGÂNICOS EM ALIMENTOS**. Brasília, p. 2. 2013.
- 24 CERVEJA. Mateiras primas, para fazer cerveja, se seguirmos os princípios da lei de pureza alemã (Reinheitsgebot) só precisaremos de 4 ingredientes: Água, Malte, Lúpulo e Fermento. **Como Fazer Cerveja**. Disponível em: <http://www.comofazercerveja.com.br/conteudo/view?ID_CONTEUDO=14>. Acesso em: 08 Maio 2016.
- 25 PREEDY, V. R. **Beer in Health and Disease Prevention**. London: Elsevier, v. 1, 2009.

26 POREDA, A. et al. Corn grist adjunct – application and influence on the brewing process and beer quality. **Journal of the Institute of Brewing**, Krakow, v. 120, n. 1, p. 77-81, 2014.

27 BAMFORTH, C.. **Beer Health and Nutrition**. [S.l.]: Blackwell Science, 2004.

28 APCV. Associação Portuguesa dos Produtores de Cerveja. **Ingredientes da cerveja**. Disponível em: <<http://www.apcv.pt/pdfs/lupulo.pdf>>. Acesso em: 08 Novembro 2015.

29 KONDO, K. Beer and health: preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. **BioFactors**, Tokyou, v. 22, p. 303-310, 2004.

30 BRITO, et al. Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. **Food Chemistry**, Rio de Janeiro, v. 199, n. 1^a, p. 105-113, Maio 2016.

31 HEINEKEN. Pilsen, Ale, Stout, Bock, Lager: qual é a diferença? Disponível em: <<http://heinekenbrasil.com.br/?Curiosidades-pilsen-ale-stout-bock-lager-qual-e-a-diferenca>>. Acesso em: 12 Janeiro 2016.

32 LEWIS, M. ; BAMFORTH, C.. **Essays in Brewing Science**. 1^a. ed. California: Springer Science+Business Media, 2006.

33 ETICHA, ; HYMETE,. Health Risk Assessment of Heavy Metals in Locally Produced Beer to the Population in Ethiopia. **Bioanalysis & Biomedicine**, Mekelle, v. 6, n. 6, p. 65-68, 2014.

34 KHAN, et al. Health risks of heavy metals in contaminated soils and food crops irrigated with wastewater in Beijing, China. **Environmental Pollution**, Beijing, v. 152, n. 3, p. 686–692, 2008.

35 POTTS, P. J. **A handbook of silicate rock analysis**. 1^a. ed. New York: Springer Science Business Media, 1992.

36 WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic Absorption Spectrometry**. 3. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 1999.

37 TECHNOLOGIES, A. Runs On Air.AGILENT 4100 MICROWAVE PLASMA–ATOMIC EMISSION SPECTROMETER. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5990-8572EN_4100_MPAES_Brochure.pdf>. Acesso em: 13 Maio 2016.

38 ZHAO, et al. Determination of heavy metals in leather and fur by microwave plasma-atomic emission spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B**, Beijing, v. 112, p. 6–9, 2015.

39 DONATI, G. L. et al. Determination of Cr, Ni, Pb and V in gasoline and ethanol fuel by microwave plasma optical emission. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, São Carlos, v. 28, n. 5, p. 755-759, 2012.

40 OZBEK, N.; AKMAN,. Determination of boron in Turkish wines by microwave plasma atomic emission spectrometry. **LWT - Food Science and Technology**, Istanbul, v. 61, p. 532-535, 2015.

41 LI, W. et al. Microwave plasma atomic emission spectrometric determination of Ca, K and Mg in various cheese varieties. **Talanta**, Texas, v. 112, p. 2013, 43-48 2016.

42 ONIANWA, P. C. et al. Trace heavy metals composition of some Nigerian beverages and food drinks. **Food Chemistry**, Ibadan, v. 66, n. 3, p. 275–279, 1999.

43 BELLIDO-MILLA, D.; MORENO-PEREZ, J. M.; HERNÁNDEZ-ARTIGA, M. Differentiation and classification of beers with flame atomic spectrometry and molecular absorption spectrometry and sample preparation assisted by microwaves. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Cadiz, v. 55, n. 7, p. 855–864, 2000.

44 BELLIDO-MILLA, D.; MORENO-PEREZ, J. M.; HERNÁNDEZ-ARTIGA, M. P. Direct determination of Cu, Mn, Pb, and Zn in beer by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, Cadiz, v. 55, n. 7, p. 855–864, 2000.

45 OÑATE-JAÉN , A.; BELLIDO-MILLA , D.; HERNÁNDEZ-ARTIGA, M.. Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing. **Food Chemistry**, Puerto Real, v. 97, n. 2, p. 361–369, 2006.

46 POHL, P.; PRUSISZ, B. Pre-concentration of Cd, Co, Cu, Ni and Zn using different off-line ion exchange procedures followed by the inductively coupled plasma atomic emission spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, Wroclaw, v. 502, n. 1, p. 83-90, 2004.

47 ALCÁZAR, A. et al. Multivariate characterisation of beers according to their mineral content. **Talanta**, Seville, v. 57, n. 1, p. 45-52, 2002.

48 MATSUSHIGE, I.; OLIVEIRA, E. Determination of trace elements in Brazilian beers by ICP-AES. **Food Chemistry**, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 205–207, 1993.

49 PASSAGHE, P. et al. Monitoring of some selected heavy metals throughout the brewing process of craft beers by inductively coupled plasma mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, Udine, v. 241, n. 2, p. 199-215, 2015.

50 WYRZYKOWSKA, B. et al. Application of ICP sector field MS and principal component analysis for studying interdependences among 23 trace elements in Polish beers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Gdańsk, v. 49, n. 7, p. 3425-3431, 2001.

51 CHEMISTS, A. O. O. A. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 16. ed. Arlington: A.O.A.C, v. 2, 1995.

52 OLIVEIRA, M. D. et al. Evaluation of sample preparation methods for the determination of As, Cd, Pb, and Se in rice samples by GF AAS. **Microchemical Journal**, Capão do Leão, v. 124, p. 402–409, 2016.

53 ROSA, M. B. et al. Evaluation of the Use of a Reflux System for Sample Preparation of Xanthan Gum and Subsequent Determination of Ca, Cu, K, Mg, Na and Zn by Atomic Spectrometry Techniques. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Capão do Leão, v. 27, n. 5, p. 919-924, 2016.

54 PINHEIRO, A. C. D. A. et al. Avaliação da mineralização de arroz em sistema de refluxo para a determinação de Cu, Fe, Mn e Zn por FAAS. **Química Nova**, Capão do Leão, v. 37, n. 1, p. 6-9, 2014.

55 LOPEZ, F. F. et al. Aluminium levels in wine, beer and other alcoholic beverages consumed in Spain. **Science of The Total Environment**, Granada, v. 220, n. 1, p. 1-9, 1998.

56 YBÁÑEZ, N.; NAVARRO, A.; MONTORO, R. DETERMINATION OF CADMIUM, COBALT, COPPER, LEAD AND ZINC IN BEER BY FLAME ATOMIC ABSORPTION SPECTROSCOPY. **Journal of the Institute of Brewing**, Madrid, v. 95, n. 4, p. 257-262, 1989.

57 UBUOH, E. A.; COMAS, U.; EZE, E. C. Analysis of Metal Concentrations in Selected Canned Beers Consumed in Owerri Urban, Imo state,

Nigeria. **European International Journal of Science and Technology**, Imo, v. 2, n. 8, p. 35-42, 2013.

58 ASFAW, A.; WIBETOE, G. Direct Analysis of Beer by ICP-AES: A Very Simple Method for the Determination of Cu, Mn and Fe. **Microchim Acta**, Oslo, v. 152, n. 1, p. 61-68, 2005.

59 BORGES, S. S. D. O.; BEINNER, M. ; SILVA, J. B.. Direct Method for Determination of Al, Cd, Cu, and Pb in Beers In Situ Digested by GF AAS Using Permanent Modifiers. **Biological Trace Element Research**, Uberlândia, v. 167, n. 1, p. 155-163, 2015.

60 MARCANO, E. et al. Estudio preliminar sobre la determinación de elementos traza en cervezas venezolanas por icp-oes. **Químca Nova**, Caracas, v. 33, n. 3, p. 653-655, 2010.

61 ORESTE, E. Q. et al. New design of cold finger for sample preparation in open system: Determination of New design of cold finger for sample preparation in open system: Determination of Hg in biological samples by CV-AAS. **Microchemical Journal**, Capão do Leão, v. 109, n. 16, p. 5-9, 2013.

62 IMETRO. **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos**. Brasília, p. 19. 2011.

63 MENA, C. et al. Cadmium levels in wine, beer and other alcoholic beverages: possible sources of contamination. **Science of The Total Environment**, Granada, v. 181, n. 3, p. 201-208, Março.

64 HUSÁKOVÁ, L. et al. Direct determination of arsenic in beer by electrothermal atomic absorption spectrometry with deuterium background correction (D2-ET-AAS). **Food Chemistry**, Pardubice, v. 105, n. 1, p. 286-292, 2007.