

## Utilização de isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio para determinar o percentual de malte em cervejas tipo Pilsen

*Carbon and nitrogen stable isotopes used to determine the percentage of malt in Pilsen beer*

### Autores | Authors

#### Muris SLEIMAN

BevHall Tecnologia em Bebidas  
Incubadora de Base Tecnológica de Botucatu  
Fazenda Experimental Lageado  
e-mail: contato@bevhall.com.br

#### ✉ Waldemar Gastoni VENTURINI FILHO

Universidade Estadual Paulista (UNESP)  
Faculdade de Ciências Agrônomicas –  
Campus de Botucatu  
Departamento de Gestão e Tecnologia  
Agroindustrial  
Rua José Barbosa de Barros, 1780  
CEP: 18610-307  
Botucatu/SP - Brasil  
e-mail: venturini@fca.unesp.br

#### Carlos DUCATTI

Universidade Estadual Paulista (UNESP)  
Instituto de Biociências de Botucatu  
Centro de Isótopos Estáveis  
e-mail: ducatti@ibb.unesp.br

#### Toshio NOJIMOTO

Universidade Estadual Paulista (UNESP)  
Faculdade de Ciências Agrônomicas –  
Campus de Botucatu  
Departamento de Gestão e Tecnologia  
Agroindustrial  
e-mail: toshio@fca.unesp.br

✉ Autor Correspondente | Corresponding Author

Recebido | Received: 16/03/2007  
Aprovado | Approved: 30/05/2008

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia capaz de quantificar a proporção de malte utilizada no processo de fabricação de cervejas do tipo Pilsen, através de isótopos estáveis de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) e de nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ). Matérias-primas cervejeiras – malte de cevada, *grits* de milho, quirera de arroz, xarope de maltose (HMCS) e açúcar de cana – foram usadas para a produção de mostos e misturas de mostos, que após sofrerem fermentação alcoólica resultaram em fermentados, considerados padrões de referência. A partir desses padrões de referência (malte/*grits*, malte/HMCS, malte/açúcar, malte/arroz), foram geradas retas de calibração ( $h_{grits}$ ,  $h_{HMCS}$ ,  $h_{açúcar}$ ,  $h_{arroz}$ ), com intervalo de confiança de 90% para encontrar o percentual de malte presente nas cervejas. As retas encontradas foram:  $h_{grits} = -142,392-9,47784*W'$ ;  $h_{HMCS} = -181,037-11,5695*W'$ ;  $h_{açúcar} = -114,955-8,04819*W'$  e  $h_{arroz} = 325,7113-57,8928*W'$ . Concluiu-se que, a partir das análises do  $\delta^{13}\text{C}$ , pode-se encontrar o teor de malte em cervejas produzidas com malte e adjunto oriundo de planta de ciclo fotossintético  $C_4$ . Enquanto que, a partir das análises de  $\delta^{15}\text{N}$ , pode-se obter a porcentagem de malte em cervejas contendo planta do ciclo fotossintético  $C_3$  (arroz). É possível averiguar se uma cerveja classificada como puro malte realmente foi produzida exclusivamente com malte de cevada, como fonte de carboidratos, ou se apresenta arroz em sua composição.

**Palavras-chave:**  $\delta^{13}\text{C}$ ;  $\delta^{15}\text{N}$ ; Espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS); Adulteração; Bebidas fermentadas.

### Summary

The aim of this study was to develop a methodology to quantify the proportion of malt used in Pilsen beer production, through stable isotopes of carbon ( $^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $^{15}\text{N}$ ). Raw materials of beer – barley malt, maize grits, broken rice, maltose syrup (HMCS) and sugar cane – were used to produce worts and worts mixtures which, after the alcoholic fermentation, were considered as reference standards. Such standards (malt/grits, malt/HMCS, malt/sugar, malt/rice) generated calibration lines ( $h_{grits}$ ,  $h_{HMCS}$ ,  $h_{sugar}$ ,  $h_{rice}$ ) with the purpose of determining the percentage of malt in beer, with a confidence interval of 90%. The lines found were:  $h_{grits} = -142,392-9,47784*W'$ ;  $h_{HMCS} = -181,037-11,5695*W'$ ;  $h_{sugar} = -114,955-8,04819*W'$  e  $h_{rice} = 325,7113 -57,8928*W'$ . It was concluded that by analyzing the  $\delta^{13}\text{C}$ , one can find the content of malt in beer produced with malt and additions from plants of the  $C_4$  photosynthetic cycle; while the analysis of  $\delta^{15}\text{N}$  provides the percentage of malt in beer with rice, plant of  $C_3$  photosynthetic cycle. Using this procedure it should be possible to verify whether a beer classified as 100% malt was solely produced with barley malt or if it has rice in its composition.

**Key words:**  $\delta^{13}\text{C}$ ;  $\delta^{15}\text{N}$ ; Isotopic ratio mass spectrometer (IRMS); Adulteration; Fermented beverages.

## Utilização de isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio para determinar o percentual de malte em cervejas tipo Pilsen

SLEIMAN, M. et al.

### 1 Introdução

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de cerveja, com produção em torno de 9,5 bilhões de litros em 2006 e consumo de 51,2 L *per capita*/ano (PARRA, 2007; FERNANDES, 2007). O mercado brasileiro de cerveja é gigantesco e está em expansão, por este motivo é alvo de fraude e pirataria (PARAÍSO, 2002; LAGO, 2003; CERVEJA, 2004; DEBIAN, 2005).

Vários países, inclusive o Brasil, permitem a utilização de adjuntos na fabricação de cervejas, em substituição parcial do malte de cevada. Cada empresa define a proporção de malte e adjunto em seus produtos, conforme lhe convém, seguindo uma tendência mundial de aumento de adjuntos por parte das cervejarias (VENTURINI FILHO, 2000; ALMEIDA e SILVA, 2005).

No Brasil, o Decreto nº 2.314 de 1997 estabelece as normas gerais sobre registro, padronização, classificação, inspeção, fiscalização e controle da produção e comércio de bebidas no país. Este Decreto estabelece que parte do malte de cevada poderá ser substituída por adjuntos (cevada, arroz, trigo, centeio, milho, aveia e sorgo, integrais, em flocos ou a sua parte amilácea) e por carboidratos (açúcar) de origem vegetal. A substituição do malte ou do seu extrato por adjuntos cervejeiros não pode ser superior a 50% (BRASIL, 1997).

Sabe-se que os adjuntos mais empregados no Brasil são: o xarope de maltose (*high maltose corn sirup* - HMCS), o *grits* de milho e a quirera de arroz, além de possíveis introduções de açúcar de cana.

Isótopos são átomos de um mesmo elemento químico que apresentam o mesmo número de prótons e diferentes números de nêutrons em seu núcleo, ou seja, apresentam propriedades químicas iguais e físicas diferentes (BOUTTON, 1991). Isótopos estáveis são aqueles que não emitem radiação, sendo que os elementos carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre apresentam interesse biológico e ocorrem naturalmente (SLEIMAN, 2006). Os isótopos mais leves ( $^1\text{H}$ ,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$ ,  $^{32}\text{S}$ ), em geral, são mais abundantes que os mais pesados ( $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{33}\text{S}$ ,  $^{34}\text{S}$ ,  $^{36}\text{S}$ ).

No estudo da variabilidade isotópica natural dos elementos, utiliza-se a terminologia "delta *per mil*" ( $\delta\%$ ), na qual a razão isotópica da amostra é comparada com a razão isotópica de um padrão internacional (V-PDB para o carbono e nitrogênio atmosférico para o nitrogênio), conforme Equação 1.

$$\delta X\%_{(amostra,padr\tilde{a}o)} = \left( \frac{R_{amostra} - R_{padr\tilde{a}o}}{R_{padr\tilde{a}o}} \right) * 10^3 \quad (1)$$

R = razão isotópica  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ .

$\delta X\%$  <sub>(amostra,padrão)</sub> = enriquecimento isotópico da amostra relativo ao padrão, para um elemento químico genérico.

As mensurações são efetuadas em espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS) com erro analítico da ordem de 0,2%. Valores isotópicos com sinal negativo significam que a amostra apresenta menos isótopo pesado que o padrão.

As duas principais vias bioquímicas para a fixação de carbono na fotossíntese, de interesse para o ramo cervejeiro, são as de plantas com o ciclo fotossintético de Calvin – Benson (plantas de ciclo  $C_3$ ) e de plantas com ciclo fotossintético de Hatch – Slack (plantas de ciclo  $C_4$ ). As plantas de ciclo  $C_3$  apresentam valores isotópicos médios de  $\delta^{13}\text{C}$  de  $-27\%$  (VOGEL, 1993; BOUTTON, 1996), enquanto que as plantas de ciclo  $C_4$  apresentam  $\delta^{13}\text{C}$  médio de  $-11\%$  (VOGEL, 1993). A cevada, o arroz e o trigo usados na fabricação de cerveja são exemplos de plantas  $C_3$ , e o milho, a cana-de-açúcar e o sorgo são plantas do grupo  $C_4$  (CONTREIRAS, 1992).

O nitrogênio está presente em aminoácidos, proteínas, enzimas, etc. As plantas apresentam rotas metabólicas distintas quanto ao aproveitamento das fontes de nitrogênio disponível para absorção. A incorporação do elemento à planta se dá por diferentes processos, que variam de acordo com a espécie, a cultivar, a presença de microrganismos fixadores de nitrogênio, o ambiente e a forma do nutriente (HAYNES, 1986).

Quando duas fontes (matérias-primas) que diferem em sua composição isotópica são uniformemente misturadas, resultam numa composição que reflete as quantidades relativas dessas fontes (WAREMBOURG, 1993). Na presença de somente duas fontes isotopicamente diferentes (exemplo: malte e milho) na elaboração da cerveja, utilizam-se os isótopos estáveis de um único elemento químico – neste caso, o carbono, para quantificar a proporção das matérias-primas empregadas na obtenção do produto. Esta quantificação é feita através da Equação 2, cujo valor de  $\delta^{13}\text{C}$  do produto reflete a proporção de  $^{13}\text{C}$  de cada fonte (SLEIMAN, 2006). Semelhante consideração é válida para o  $\delta^{15}\text{N}$ .

$$[\delta a * (A)] + [\delta b * (B)] = \delta P \quad (2)$$

$\delta a$  e  $\delta b$  = enriquecimento relativo ( $\delta^{13}\text{C}$ ) das fontes de carbono;

$\delta P$  = enriquecimento relativo ( $\delta^{13}\text{C}$ ) do produto;

A e B = proporções relativas das fontes (matérias-primas), para as quais  $A + B = 1$ .

Nos últimos anos, as determinações das razões de isótopos estáveis de carbono, hidrogênio e oxigênio foram aplicadas para elucidar vias bioquímicas e mecanismos de reações, além de viabilizar o controle de autenticidade e origem de substâncias específicas, ingredientes ou do

## Utilização de isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio para determinar o percentual de malte em cervejas tipo Pilsen

SLEIMAN, M. et al.

produto alimentício processado (ROSSMANN, 2001). A aplicabilidade desse método é uma ferramenta importante na determinação de adulteração e controle de qualidade de alimentos e bebidas, o que permite verificar a autenticidade de sucos de frutas, vinhos, destilados e cervejas (SUHAJ e KOVAC, 1999).

Valores isotópicos da matéria-prima são muito semelhantes aos respectivos valores do produto industrializado. Este fato permite detectar adulteração fraudulenta em méis, xaropes, vinagres, etanol, destilados, cervejas, conhaques, óleos, compostos aromáticos, aditivos, entre outros (WINKLER e SCHMIDT, 1980).

Oliveira et al. (2002) utilizaram os isótopos estáveis do carbono para identificar a porcentagem de plantas de ciclo  $C_3$  e  $C_4$  em amostras de café, vinho, vodka e cerveja, e compararam os resultados obtidos pela análise de  $\delta^{13}C$  com o preço das bebidas comercializadas no Brasil. Os autores concluíram que a presença de material de origem  $C_4$  em café (o que é proibido) altera o seu sabor; e em bebidas, como cerveja e vodka, em que a legislação permite a adição de plantas  $C_4$  à bebida, a metodologia isotópica pode ser útil na detecção da presença de ingredientes não especificados claramente no rótulo.

Brooks et al. (2002), que analisaram matérias-primas e cervejas de diversos países, afirmaram que a análise do  $\delta^{13}C$  permite uma detecção acurada de carbono de plantas  $C_4$  em cervejas, porém não podem detectar todos os adjuntos, como por exemplo, o arroz ( $C_3$ ). Para a verificação do  $\delta^{13}C$  da bebida, os autores desidrataram-na a 60 °C e submeteram a fração de sólidos solúveis (não volátil) à análise. Afirmaram também que as massas de carbono originárias de lúpulo e de fermento utilizados no processo de fabricação de cerveja são muito menores que as massas de carbono de malte e adjuntos presentes no mosto. Em seu experimento, os autores removeram o lúpulo do processo e separaram a levedura, haja vista que o valor de  $\delta^{13}C$  do lúpulo e da levedura não apresentam importância quantitativa quando comparados ao malte.

Rossete et al. (2002) determinaram a razão isotópica  $\delta^{13}C$  de 20 marcas comerciais de cervejas tipo Pilsen nacionais, utilizando sorbitol como agente dessecante, e concluíram que todas elas apresentavam cereais não maltados, originários de plantas de ciclo fotossintético  $C_4$  em sua composição. Os autores também afirmaram que analisando apenas o isótopo de carbono, não é possível detectar a presença de plantas de ciclo  $C_3$ , como o arroz, usado como adjunto cervejeiro.

A determinação da razão isotópica de carbono e nitrogênio foi realizada em matérias-primas utilizadas no processo de fabricação cervejeira (SLEIMAN, 2006), e demonstrou ser possível a diferenciação de matérias-primas de mesmo ciclo fotossintético (cevada e arroz, ambas  $C_3$ ), conforme mostra a Figura 1.

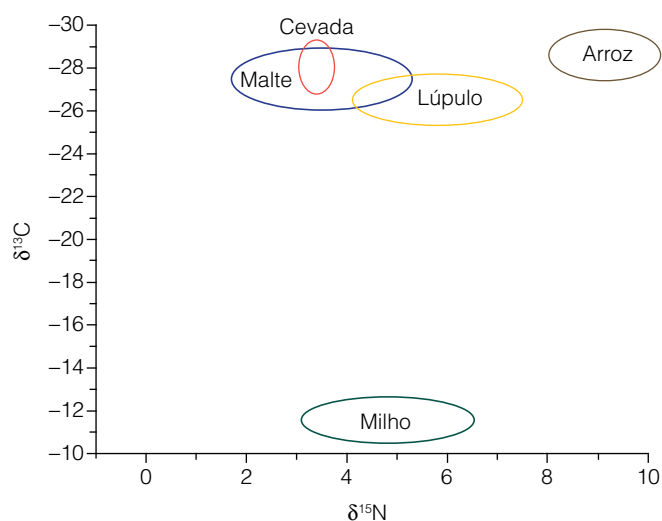


Figura 1.  $\delta^{13}C$  e  $\delta^{15}N$  nas matérias-primas utilizadas na fabricação de cervejas.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para quantificar a proporção de malte utilizada na fabricação de cervejas do tipo Pilsen, utilizando-se isótopos estáveis de carbono ( $\delta^{13}C$ ) e de nitrogênio ( $\delta^{15}N$ ), haja vista não existir uma metodologia capaz de quantificar a proporção de malte empregada na sua formulação, o que dificulta a fiscalização e detecção de produtos fora dos padrões de identidade e qualidade exigidos por lei.

## 2 Material e métodos

Neste trabalho foram utilizadas as seguintes matérias-primas: malte, xarope de maltose de milho (*high maltose corn sirup* - HMCS), *grits* de milho e quirera de arroz, além de açúcar de cana.

Foram produzidos mostos (padrões de referência) de malte, de *grits*, de HMCS, de açúcar de cana e de quirera de arroz. Para a produção de mostos de arroz e de *grits*, buscou-se uma alternativa na qual não se adicionasse qualquer outra fonte de carbono e nitrogênio. Para isso, houve a necessidade de se realizar a hidrólise ácida (BOBBIO e BOBBIO, 1992), utilizando-se HCl 1N a 120 °C por 2 h. Após o resfriamento, os mostos foram filtrados em papel de filtro comum para retirar o material sólido e seu pH foi corrigido para 5,1 (faixa de pH de mostos cervejeiros), utilizando-se solução de NaOH 1N. Os mostos de HMCS e de açúcar de cana foram elaborados pela simples diluição destas matérias-primas em água.

A partir desses mostos, foram realizadas misturas (massa/massa), obtendo-se mostos compostos com diferentes percentagens de malte e adjunto (Tabela 1), que serviram para a criação das "retas de calibração". Todos os mostos foram preparados a 12 °Brix e fermentados nas mesmas condições, utilizando-se uma levedura cervejeira.

## Utilização de isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio para determinar o percentual de malte em cervejas tipo Pilsen

SLEIMAN, M. et al.

**Tabela 1.** Percentagens de malte na formulação dos mostos para a elaboração das retas de calibração (*grits*, HMCS, açúcar ou arroz).

% malte para mostos contendo <i>grits</i>	% malte para mostos contendo HMCS	% malte para mostos contendo açúcar	% malte para mostos contendo arroz
100,0	-	-	100,0
-	90,0	-	90,0
-	70,0	70,0	-
60,0	-	60,0	60,0
55,0	55,0	-	55,0
52,0	52,0	-	-
51,0	51,0	-	-
50,0	50,0	50,0	50,0
49,0	-	-	49,0
-	45,0	-	45,0
40,0	40,0	-	40,0
-	30,0	-	30,0
20,0	-	-	20,0
10,0	10,0	-	-
-	-	0,0	0,0

jeira de baixa fermentação da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, à temperatura de 10 °C.

Testes preliminares utilizando mostos produzidos com lúpulo em proporções semelhantes aos de mostos cervejeiros, revelaram que sua presença não interferiu de modo significativo nos valores isotópicos ( $\delta^{13}\text{C}$  e  $\delta^{15}\text{N}$ ), quando comparados aos de mostos produzidos sem sua utilização. Em função disto, os padrões de referência não foram produzidos com lúpulo.

Para a realização das análises isotópicas dos fermentados (padrões de referência) e suas misturas, procedeu-se da seguinte maneira:

- determinação dos valores de  $\delta^{13}\text{C}$  – descarbonatação da amostra, seguindo-se retirada de uma alíquota de 1,1  $\mu\text{L}$ , que foi transferida para cápsula de estanho contendo *chromosorb* e posteriormente introduzida em analisador elementar (EA 1108 – *CHN Fisons Elemental Analyzer*), onde sofreu combustão total a 1.020 °C. O  $\text{CO}_2$  resultante foi direcionado ao espectrômetro de massa de razão isotópica (IRMS - *Delta S Finnigan Mat*), para leitura de valor do  $\delta^{13}\text{C}$ , conforme BRASIL (2000);
- determinação dos valores de  $\delta^{15}\text{N}$  – desidratação das amostras e transferência de alíquota de 150 a 180  $\mu\text{g}$  para as cápsulas, que foram colocadas no analisador elementar (EA 1108 – *CHN Fisons Elemental Analyzer*), para combustão. O  $\text{N}_2$  e os óxidos de nitrogênio da amostra passam por uma coluna de  $\text{Cu}$  a 650 °C para a conversão

completa em  $\text{N}_2$ . Este gás foi introduzido no espectrômetro de massa para leitura de valor do  $\delta^{15}\text{N}$ . O  $\text{CO}_2$  gerado nesta etapa foi retido com *carbosorb* e a água retida com perclorato de magnésio.

As “retas de calibração” foram criadas conforme a Equação 3, que possibilita determinar o percentual de malte da amostra.

$$h_{\text{adjunto}} = c + d * W \quad (3)$$

$h_{\text{adjunto}}$  = porcentagem de malte na amostra (malte/adjunto), sabendo-se que o adjunto pode ser *grits*, HMCS, açúcar ou arroz;

$c$  = coeficiente linear da reta;

$d$  = coeficiente angular da reta;

$W$  = valor de  $\delta^{13}\text{C}$  ou  $\delta^{15}\text{N}$  da amostra.

Também foi delimitado um intervalo de confiança de 90% (Equação 4) (HOFFMAN e VIEIRA, 1998) para as retas  $h_{\text{adjunto}}$ .

$$\text{IC}(Y) = h_{\text{adjunto}} \pm t_{(n-2)} * s_e * \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(W - W_m)^2}{\sum (W - W_m)^2}} \quad (4)$$

IC (Y) = intervalo de confiança para o eixo Y;

$h_{\text{adjunto}}$  = porcentagem de malte na amostra;

$t_{(n-2)}$  = valores críticos encontrados na tabela de Distribuição de Student, tais que:  $P(-tc < t < tc) = 1 - p$ ,

$s_e$  = raiz quadrada do quadrado médio do resíduo,

$n$  = número de observações,

$W$  = valor observado de  $\delta^{13}\text{C}$  ou  $\delta^{15}\text{N}$  da amostra analisada,

$W_m$  = valor médio de  $\delta^{13}\text{C}$  ou  $\delta^{15}\text{N}$  das  $n$  observações.

A relação da Equação 5 foi estimada a partir de dados experimentais obtidos com os valores mostrados na Tabela 1, cujos valores observados de  $\delta^{13}\text{C}$  ou  $\delta^{15}\text{N}$  da amostra analisada são variáveis dependentes (eixo Y) do percentual de malte (eixo X). Essa equação não é exata, ou seja,  $R^2 < 1$  (o valor de X tem variância em função da diversidade de matérias-primas, origem, processamento e inexactidão das massas).

$$Y = f(X) = a + b * X \quad (5)$$

$Y$  = valor observado de  $\delta^{13}\text{C}$  ou  $\delta^{15}\text{N}$  nos fermentados padrão, em que Y é função de X;

$X$  = percentual de malte utilizado na elaboração do mosto;

$a$  = coeficiente linear da reta;

$b$  = coeficiente angular da reta.

Todavia, pretende-se utilizar a equação como instrumento de previsão de Y (variável dependente):

## Utilização de isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio para determinar o percentual de malte em cervejas tipo Pilsen

SLEIMAN, M. et al.

% de malte) a partir de X (variável independente:  $\delta^{13}\text{C}$  ou  $\delta^{15}\text{N}$ ), e para isso foi realizada análise de regressão linear invertida, utilizando-se o *software* Microsoft Excel. Isso significa dizer que os valores de Y foram inseridos no eixo X e vice-versa. Sendo assim, nos cálculos dos testes experimentais foram levadas em conta as seguintes considerações: a variável Y (% de malte) é a variável controlada, e a variável X (valor isotópico revelado experimentalmente) é dada pela Equação 6, a qual não pode ser considerada uma função.

$$X = f(Y) \quad (6)$$

A partir dos dados experimentais, foi estimado o intervalo de confiança de 90%, de Y em função de X (para dado valor de X encontrado, o valor de Y estará contido no intervalo determinado), o que eleva a garantia de utilização do modelo em futuras previsões de resultados encontrados na população. Por exemplo, para  $\delta^{13}\text{C}$  encontrado igual a  $-22,1\%$  corresponde a um teor de 64,0 a 70,1% de malte, a 90% de confiança, para mostos fabricados com malte e *grits*.

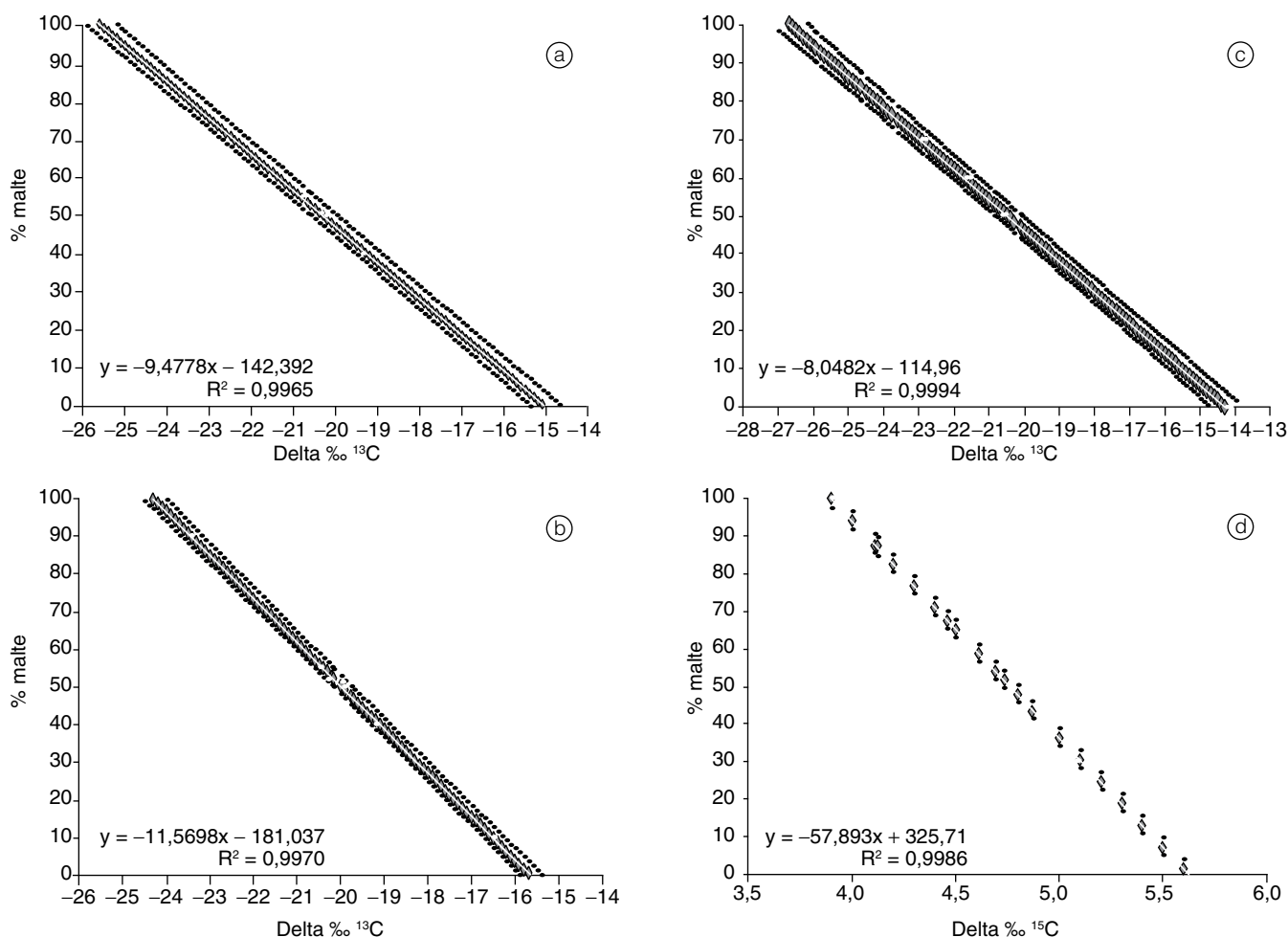
Dessa forma, o intervalo de confiança Y, gerado a partir de um valor X, pode resultar em valores matemáticos superiores a 100% e inferiores a 0% de  $C_3$ , na quantificação do malte. Esses valores devem ser desconsiderados. Por exemplo, para mostos fabricados com malte e *grits*, o valor de  $-25,4\%$  para o  $\delta^{13}\text{C}$  corresponde a um teor de 94,8 a 101,9% de malte, sabendo-se que o máximo possível é 100%.

### 3 Resultados e discussão

Com os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  dos fermentados de malte, dos fermentados de *grits* e de suas misturas foi determinada a Equação 7, da reta de calibração ( $h_{grits}$ ). O intervalo de confiança de 90% pode ser observado na Figura 2a (retas semi-paralelas externas à reta de calibração ( $h_{grits}$ ), ao centro).

$$h_{grits}(\%malte) = -142,392 - 9,47784 * W' \quad (7)$$

De maneira semelhante, foram encontradas as Equações 8 ( $h_{HMCS}$ ), 9 ( $h_{açúcar}$ ) e 10 ( $h_{arroz}$ ). A Equação 8



**Figura 2.** Reta de calibração e intervalo de confiança de 90% para cervejas produzidas com **a)** malte e *grits*; **b)** malte e HMCS; **c)** malte e açúcar de cana; e **d)** malte e arroz.

## Utilização de isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio para determinar o percentual de malte em cervejas tipo Pilsen

SLEIMAN, M. et al.

foi obtida a partir de valores de  $\delta^{13}\text{C}$  de fermentados de malte, de HMCS e de suas misturas, a Equação 9 ( $h_{\text{açúcar}}$ ) foi obtida para fermentados de malte, de açúcar de cana e de suas misturas. A partir de valores de  $\delta^{15}\text{N}$ , encontrou-se a reta de calibração da Equação 10 ( $h_{\text{arroz}}$ ), segundo a qual é possível verificar a presença de arroz (ciclo fotossintético  $\text{C}_3$ ) em cervejas. Em todas elas, o intervalo de confiança foi calculado a 90%.

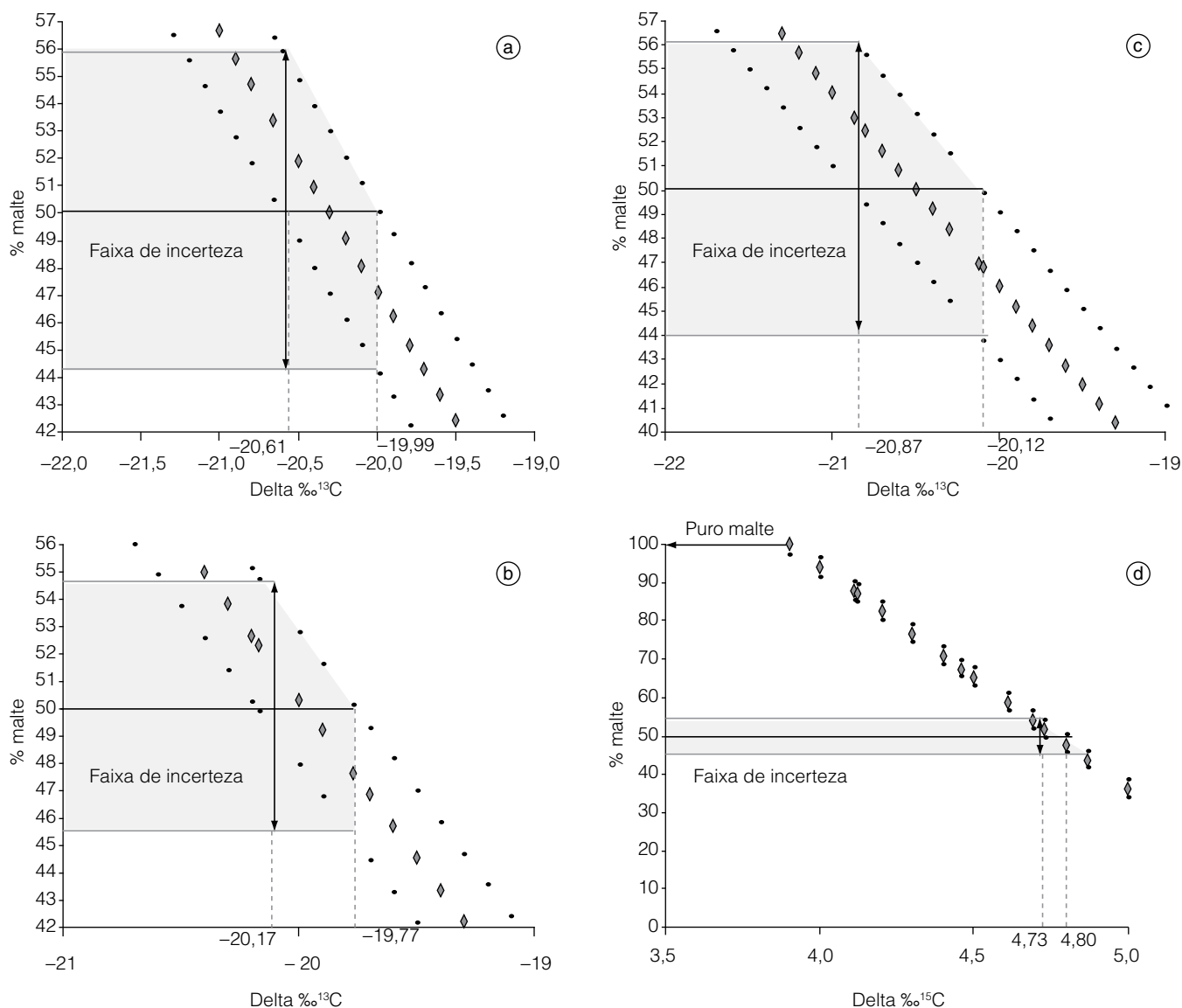
$$h_{\text{HMCS}}(\% \text{malte}) = -181,037 - 11,5695 * W' \quad (8)$$

$$h_{\text{açúcar}}(\% \text{malte}) = -114,955 - 8,04819 * W' \quad (9)$$

$$h_{\text{arroz}}(\% \text{malte}) = 325,7113 - 57,8928 * W' \quad (10)$$

Convém ressaltar que, a aplicação da Equação 10 somente se faz necessária caso os valores de  $\delta^{13}\text{C}$  indiquem a possibilidade da cerveja ter sido fabricada exclusivamente com plantas de ciclo fotossintético  $\text{C}_3$ , entre as quais também se incluem as cervejas consideradas "puro malte".

A legislação brasileira, através do Decreto nº 2.314 (BRASIL, 1997), classifica como cerveja aquela que apresenta o mínimo de 50% de malte como fonte de extrato em sua composição. Para cada adjunto utilizado (Figura 2a, 2b, 2c, 2d) há um intervalo de valores que poderiam gerar dúvida quanto ao percentual de malte da amostra, e conseqüentes dúvidas sobre a conformidade da cerveja, em relação à legislação. A esse intervalo atribuiu-se o nome de faixa de incerteza quanto ao percentual de malte (Figura 3a, 3b, 3c, 3d). Portanto, a faixa de incerteza é



**Figura 3.** Faixas de incerteza quanto ao percentual de malte (intervalo estimado em Y) geradas a partir de determinado valor de  $\delta^{13}\text{C}$  ou  $\delta^{15}\text{N}$  (eixo X) para mostos fabricados com **a)** malte e *grits*; **b)** malte e HMCS; **c)** malte e açúcar de cana; e **d)** malte e arroz.

## Utilização de isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio para determinar o percentual de malte em cervejas tipo Pilsen

SLEIMAN, M. et al.

definida como o intervalo em Y, que compreende desde um valor inferior a 50% até outro valor superior a 50% de malte, impossibilitando afirmar se a referida amostra de cerveja está dentro dos padrões considerados legais ou não.

Pode-se observar na Figura 3a que a faixa de incerteza para mostos fabricados com malte e *grits* vai de 44,1 a 55,9% de malte. Enquanto que valores em X iguais, ou mais pesados que -19,98 resultam em cervejas adulteradas, uma vez que o intervalo correspondente vai de 44,0 a 49,9% de malte. E valores iguais ou mais leves que -20,62 resultam em cervejas dentro dos padrões legais.

A faixa de incerteza para fermentados fabricados com malte e HMCS (Figura 3b) vai de 45,3 a 54,7% de malte. De forma análoga, valores iguais ou mais pesados que -19,76 resultam em cervejas adulteradas, e valores iguais ou mais leves que -20,18 resultam em cervejas dentro dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira.

O Decreto nº 2.314 (BRASIL, 1997) afirma que a quantidade de açúcar empregada na elaboração da cerveja não pode ser superior a 15% na cerveja clara, 10% na cerveja extra e 50% na cerveja escura (tipo *Malzbier*, por exemplo, que é fabricada com a Pilsen adicionada de açúcar e caramelo), em relação ao seu extrato primitivo (BRASIL, 1997). Entretanto, pela metodologia apresentada não é possível identificar se o adjunto utilizado é proveniente de milho (*grits* ou HMCS) ou cana (açúcar) – plantas de ciclo  $C_4$ . A ocorrência de duas fontes de plantas  $C_4$ , simultaneamente, nas cervejas, não foi avaliada.

Assim, para fermentados fabricados com malte e açúcar (Figura 3c), a faixa de incerteza vai de 43,9 a 56,1% de malte. Valores iguais ou mais pesados que -20,11 resultam em cervejas adulteradas, e valores iguais ou mais leves que -20,88 resultam em cervejas dentro do que determina a legislação.

A partir de todos os resultados apresentados, pode-se afirmar que valores de  $\delta^{13}C$  mais pesados que -19,77‰ representam cervejas adulteradas, seja qual for o adjunto utilizado em sua fabricação.

Para cervejas elaboradas com malte e arroz também foi possível dimensionar a faixa de incerteza (Figura 3d), que varia de 45,5 a 54,2% de malte.

Valores iguais ou maiores que 4,81 refletem cervejas adulteradas com arroz, valores iguais ou menores que 4,72 são cervejas dentro dos padrões legais. As cervejas que apresentarem valor isotópico para carbono ( $\delta^{13}C$ ) característico de plantas de ciclo fotossintético  $C_3$  e valor isotópico para nitrogênio com valor inferior a 3,85 são cervejas definidas como “puro malte” de acordo com o Decreto nº 2.314 (BRASIL, 1997).

Após o desenvolvimento da metodologia apresentada, foram analisadas 161 amostras de cervejas tipo Pilsen, de marcas comerciais provenientes de fábricas situadas em 17 estados brasileiros. Entretanto, por não se tratar dos objetivos aqui apresentados, seus resultados e conclusões serão oportunamente publicados.

## 4 Conclusões

A partir das análises do  $\delta^{13}C$ , pode-se encontrar o percentual de malte em cervejas elaboradas com malte e adjunto oriundo de planta de ciclo fotossintético  $C_4$ , e a partir das análises de  $\delta^{15}N$ , pode-se calcular o teor de malte em fermentado contendo arroz, planta ciclo fotossintético  $C_3$ .

O desenvolvimento teórico-prático da aplicação de isótopos de carbono ( $\delta^{13}C$ ) e de nitrogênio ( $\delta^{15}N$ ) mostrou-se viável para a quantificação do percentual de malte e adjuntos presentes em cervejas tipo Pilsen.

É possível determinar se uma cerveja classificada como puro malte foi produzida exclusivamente com malte de cevada, ou se apresenta arroz em sua composição.

## Agradecimentos

À FAPESP – processo nº 03/05467-2.

## Referências

- ALMEIDA e SILVA, J. B. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Coord.). **Tecnologia de bebidas**: matéria-prima, processamento, BPF/APPCC, legislação e mercado. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. cap. 15, p. 347-382.
- BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Varela, 1992. 41 p.
- BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of natural materials: I. sample preparation and mass spectrometric analysis. In: COLEMAN, D.C.; FRY, B. **Carbon isotope techniques**. San Diego: Academic Press, 1991. cap. 10, p. 155-171.
- BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S.-I. (Ed). **Mass Spectrometry of soils**. New York: Marcel Dekker, 1996. cap. 2, p. 47-82.
- BRASIL. **Decreto n. 2.314**, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <[http://www.dfasp.gov.br/sipag\\_vegetal/legislacao/19970905DEC02314.doc](http://www.dfasp.gov.br/sipag_vegetal/legislacao/19970905DEC02314.doc)>. Acesso em: 3 mar. 2008.
- BRASIL. Portaria nº 30, de 14 de setembro de 2000. Metodologia de análise da razão isotópica  $^{13}C/^{12}C$  em produtos e subprodutos das plantas do ciclo fotossintético  $C_3$  e  $C_4$ . **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, p. 18-19.

**Utilização de isótopos estáveis do carbono e do nitrogênio para determinar o percentual de malte em cervejas tipo Pilsen**SLEIMAN, M. *et al.*

- BRASIL. **Instrução Normativa nº 54**, de 5 de novembro de 2001. Regulamento Técnico que aprova o MERCOSUL de Produtos de Cervejaria. Disponível em: <<http://www.dfasp.gov.br/siv/legislacao/20011105IN054.doc>>. Acesso em: 1 set. 2005.
- BROOKS, J. R. *et al.* Heavy and light beer: a carbon isotope approach to detect C<sub>4</sub> carbon in beer of different origins, styles and prices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 22, p. 6413-6418, 2002.
- CERVEJA falsa na Baixada. **Jornal do Brasil**, Rio de Janeiro, 28 maio 2004. Disponível em: <<http://www.unafisco.org.br/noticias/clipping/2004/SRF%20280504.doc>>. Acesso em: 25 nov. 2005.
- CONTREIRAS, J. **Fisiologia e bioquímica da respiração das plantas superiores**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1992. 312 p.
- DEBIAN, R. Polícia apreende 305 caixas de cerveja falsificada em Uberlândia. **Betim.com**, Betim, 17 jun. 2005. Disponível em: <[http://www.betim.org/jornal\\_noticias.asp?codnoticia=1474](http://www.betim.org/jornal_noticias.asp?codnoticia=1474)>. Acesso em: 07 jul. 2008.
- FERNANDES, M. Segmento cervejeiro promete crescimento sustentado. **Indústria de Bebidas**, São Paulo, ano 6, n. 30, p. 6, 2007.
- HAYNES, R. J. Uptake and assimilation of mineral nitrogen by plants. In: HAYNES, R. J. **Mineral nitrogen in the plant-soil system**. Madison: Academic Press, 1986. cap.6, p. 303-378.
- HOFFMAN, R.; VIEIRA, S. **Análise de regressão**: uma introdução à econometria. 3.ed. São Paulo: Hucitec, 1998. 379 p.
- LAGO, R. Brasil pirata. **Correio Brasiliense**, Brasília, 30 jun., 2003. Disponível em: <[http://www2.correioweb.com.br/cw/EDICAO\\_20030630/col\\_net\\_300603.htm](http://www2.correioweb.com.br/cw/EDICAO_20030630/col_net_300603.htm)>. Acesso em: 20 set. 2005.
- OLIVEIRA, A. C. B. *et al.* Isótopos estáveis e produção de bebidas: de onde vem o carbono que consumimos? **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 285-288, 2002.
- PARAÍSO da pirataria. **Jornal Nacional**, Rio de Janeiro, 08 abr., 2002. Disponível em: <<http://redglobo1.globo.com/jn/semana.jsp?id=06159>>. Acesso em: 22 mai. 2002.
- PARRA, C. D. Cervejarias ampliam para suportar crescimento. **Engarrafador Moderno**, São Paulo, ano 17, n. 157, p. 10-17, 2007.
- ROSSETE, A. L. R. M.; LOPES, F.; MARTINELLI, L. A.; BENDASSOLLI, J. A. Determinação da razão isotópica  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) de cervejas clara tipo Pilsen nacional. **Revista Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 3, p. 621-624, 2002.
- ROSSMANN, A. Determination of stable isotope ratios in food analysis. **Food Reviews International**, New York, v. 17, n. 3, p. 347-381, 2001.
- SLEIMAN, M. **Determinação do percentual de malte de cevada em cervejas tipo Pilsen utilizando os isótopos estáveis do carbono ( $\delta^{13}\text{C}$ ) e no nitrogênio ( $\delta^{15}\text{N}$ )**. Botucatu, 2006. 87 f. Tese - (Doutorado em Agronomia/ Energia na Agricultura), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.
- SUHAJ, M.; KOVAC, M. Methods to detect food adulteration and authentication: 2. Alcoholic beverages. **Bulletin of Food Research**, Bratislava, v. 39, n. 2, p. 79-83, 1999.
- VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de cerveja**. Jaboticabal: Funep, 2000. 83 p.
- VOGEL, J. C. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: EHLERINGER, J. R.; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D. (Ed.). **Stable isotopes and plant carbon**: water relations. San Diego: Academic Press, 1993. cap.4, p. 29-46.
- WAREMBOURG, F. R. Nitrogen fixation in soil and plant systems. In: KNOWLES, R.; BLACKBURN, T. H. (ed.). **Nitrogen Isotope Techniques**. San Diego: Academic Press, 1993. cap. 5, p. 127-156.
- WINKLER, F. J.; SCHMIDT, H. L. Einsatzmöglichkeiten der  $^{13}\text{C}$ -isotopen-massenspektrometrie in der lebensmitteluntersuchung. **Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, Berlim, v. 171, n. 2, p. 85-94, 1980.