

ANÁLISE DE CERVEJA NACIONAL POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Rafael Rodrigues de Aguiar¹, Adriana Lima¹, Aldirene Rocha de Souza¹, Maira Regina Rodrigues Magini², Lucia Codognoto², Hueder Paulo Moisés de Oliveira²

1. UniVap/ISE/UniVap/IP&D – Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos, SP.
rafaelraguiar@yahoo.com.br

2. UniVap/IP&D – Laboratório de Biopolímeros e Fotoquímica - Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos, SP. hueder@univap.br.

Resumo- A cerveja possui em sua composição proteínas pré-digeridas encontradas na forma de aminoácidos livres e também vitaminas como a vitamina B2 (riboflavina). A presença de aminoácidos e da vitamina B2 permite que se possa analisar a cerveja via técnicas espectroscópicas, visto que estes são fluorescentes. Neste trabalho, tratou-se a cerveja com banho ultra-sônico e, diluída em amostras com níveis de concentrações diferentes, sendo analisadas em um espectrofluorímetro, gerando espectros de fluorescência síncrona também chamada de RLS, uma vez que esta tem mostrado grande utilidade em análise de alimentos. A análise dos dados apresentaram informações importantes para a caracterização de concentração, qualidade e o ambiente em que se encontram.

Palavras-chave: Cerveja, fluorescência, aminoácido, riboflavina.

Área do conhecimento: Química.

Introdução

A cerveja possui alto valor nutritivo contendo vitaminas, minerais, carboidratos e proteínas, sendo fácil e rapidamente assimilada pelo organismo, sua análise é importante para a avaliação de suas características orgânicas, qualidade, aspectos nutricionais e segurança (ROMEO et al., 2006). A utilização do método baseado em espectroscopia de fluorescência foi reconhecida como não-invasiva, rápida e sensível, possibilitando uma maior coleta de dados em um único experimento, seu potencial tem sido utilizado para análise direta em produtos alimentícios (RAMANUJAM et al., 2000), sendo usada para monitorar a oxidação em carne de peixe, e para análise de queijos, leite e óleos comestíveis (BAUNSGAARD et al., 2000 ; LIU et al., 2007).

Dentro deste quesito, a cerveja possui em sua composição proteínas pré-digeridas encontradas na forma de aminoácidos livres e vitaminas como a vitamina B2 (riboflavina). Nos alimentos, além da função nutricional, as proteínas possuem propriedades organolépticas e de textura, podendo ser combinadas com lipídeos e carboidratos. As propriedades fluorescentes de aminoácidos aromáticos em proteínas podem ser usadas para o estudo de estruturas em proteínas ou interações entre proteínas e moléculas hidrofóbicas (LAKOWICZ, 1983; MARROLLES, et al., 2001). Os aminoácidos reconhecidos como aromáticos presentes na cerveja são triptofano, tirosina e fenilalanina, apresentando níveis de fluorescência suficientes para serem medidos diretamente em solução (TUG SEZEN, 2007), tendo o triptofano (excitação/emissão a 280/350 nm), tirosina (excitação/emissão a 275/300 nm), e

fenilalanina (excitação/emissão a 260/280 nm). A tirosina e o triptofano são fluorescentes à 280–295 nm, tornando possível e bastante comum haver transferência de energia do triptofano para a tirosina, porém com comprimentos de onda de excitação acima de 295 nm temos apenas o triptofano emitindo fluorescência, uma vez que a tirosina e a fenilalanina apresentam fluorescência quando excitados em comprimentos de onda abaixo de 280 nm (RAMANUJAM. et al., 2000), contudo o rendimento quântico de fluorescência da fenilalanina ($\Phi = 0,024$) é relativamente baixo comparado com o triptofano ($\Phi = 0,13$) e a tirosina ($\Phi = 0,14$) (LAKOWICZ, 1999), sendo que, um conteúdo típico de aminoácidos fluorescentes encontrados em cerveja é de triptofano 3.1 mg/100 g, tirosina 14.9 mg/100 g e fenilalanina 5.9 mg/100 g³, embora as quantias podem variar dependendo amplamente da escolha de matérias-primas, condições de preparo e o tipo da cerveja (EWA SIKORKA et al., 2004).

A riboflavina (7,8-dimetil-10-(1-D-ribitol) isoaloxazina) (KUYTER et al., 2004), é um pó cristalino amarelo-alaranjado, de sabor amargo e odor leve, abundantemente distribuído em gêneros alimentício animais e vegetais, tais como leite, carne, ovo, ostra, germe de trigo, nabo, beterraba, farelo de arroz (KOROLKOVAS et al., 1982). A Farmacopéia Americana (USP-23) (*The United States Pharmacopéia*. 1995) e a A.O.A.C. (Association of Official Analytical Chemists) (*Official Methods of Analysis of The AOAC*. 1984) recomenda o método fluorimétrico para a determinação de vitamina B2, cujo comprimento de onda de excitação é de 444 nm com emissão em 530 nm.

Metodologia

Todas as medidas espectrofluorimétricas foram feitas em um espectrofluorímetro Jobin-Yvon Spex fluoromax-2 com varredura de 200 a 800 nm, operando em configuração a 90° com suporte para cubetas convencionais e de excitação frontal de modo a minimizar possíveis efeitos de filtro interno primário e secundário, acoplado a um microcomputador com programa para tratamento dos dados de fluorescência.

Foi analisada uma cerveja nacional, sendo esta, dividida em quatro frascos A, B, C e D. As amostras foram tratadas com banho ultra-sônico e diluídas com água até atingirem as concentrações de 10%, 30%, 50% e 100% (pura) respectivamente, sendo condicionadas em cubetas de quartzo e analisadas em um espectrofluorímetro, gerando espectros de fluorescência síncrona (também chamado de RLS) com retardo de varredura $\Delta\lambda$ de 00, 10, 30, 60 e 80 nm, uma vez que, evidencia bandas com o aparecimento de outros componentes não presentes sem o retardo, assegurando assim uma diferença constante entre eles, tendo como resultado uma seletividade para estes componentes individuais consideravelmente melhorada, sendo ganhas muitas informações adicionais sobre misturas de combinações fluorescentes.

O espectro de fluorescência síncrona é um método muito simples e efetivo para se obter dados para varias combinações dentro de uma mistura. A forma e a intensidade do espectro síncrono dependem da diferença entre a excitação e o comprimento de onda de emissão.

Os espectros de fluorescência síncrona da Tirosina, triptofano, fenilalanina e riboflavina foram coletados em artigos e comparados com a literatura conforme figura 1.

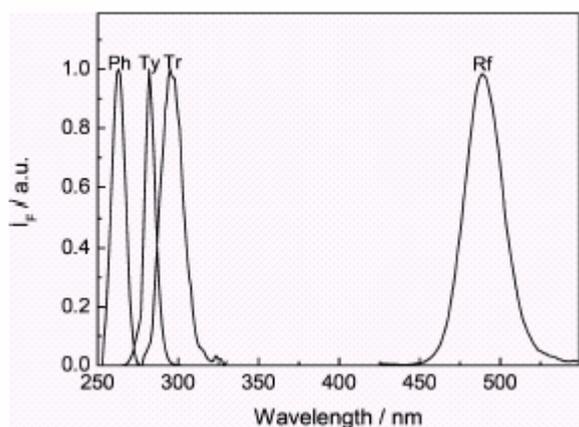


Fig.1- Espectros de fluorescência síncronos com $\Delta\lambda=10$ nm. Fenilalanina (Ph), tirosina (Ty) triptofano (Tr) e riboflavina (Rf) em água [Kuyter, M. G. M. Et. Al. 2004].

Resultados e discussão

A tirosina e o triptofano podem ser excitados com comprimentos de onda entre 280-295 nm, porém interação dipolo-dipolo torna bastante comum a transferências de energia entre orbitais eletrônicos do triptofano para a tirosina, sendo esta uma etapa primária em processos biológicos e dinâmicos no qual a velocidade de transferência depende da distancia entre o doador (triptofano) e o receptor (tirosina). Contudo com comprimentos de onda de excitação acima de 295 nm apenas o triptofano emite fluorescência, uma vez que, a fenilalanina e a tirosina são excitadas apenas com comprimentos de onda abaixo de 280 nm.

As figuras 2 e 3 ilustram o comportamento espectroscópico das amostras de cerveja diluídas em concentrações de 10% e 50% (amostras A e C) respectivamente com retardos de varredura ($\Delta\lambda$) de 00, 10, 30, 60 e 80 nm. Pode-se notar que os espectros são semelhantes ao espectro obtido com a cerveja pura, porém nota-se que no espectro da cerveja pura o aparecimento da banda mais estreita e mais intensa na região de baixos comprimentos de onda e a banda mais alargada e menos intensa na região de altos comprimentos se mostram mais definidas e intensas.

O aparecimento da banda mais estreita e intensa na região de maior energia foi atribuído aos aminoácidos existentes na composição da cerveja, porém a banda mais alargada e menos intensa na região de menor energia foi atribuída à riboflavina, contudo, comparações destes espectros com espectros obtidos da literatura do chá de lúpulo demonstraram que polifenóis complexos e iso-ácidos podem contribuir na fluorescência da cerveja, uma vez que estes são encontrados também em sua composição.

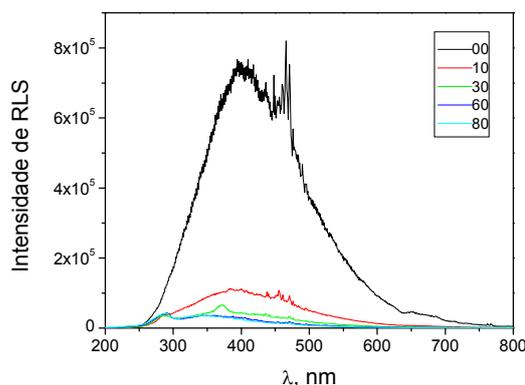


Fig.2 – Espectro de Fluorescência síncrona (RLS) da cerveja com concentração de 10% (amostra A) com retardos de varredura ($\Delta\lambda$) de 00, 10, 30, 60 e 80 nm e abertura de fenda de 1 mm.

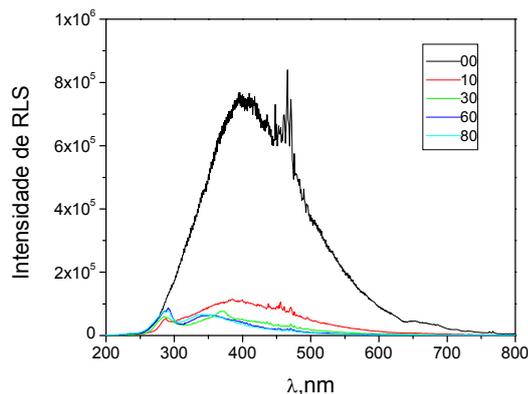


Fig.3 – Espectro de Fluorescência síncrona (RLS) da cerveja com concentração de 50% (amostra C) com retardos de varredura ($\Delta\lambda$) de 00, 10, 30, 60 e 80 nm e abertura de fenda de 1 mm.

A figura 4 ilustra o comportamento espectroscópico da amostra de cerveja pura (amostra D) com retardos de varredura ($\Delta\lambda$) de 00, 10, 30, 60 e 80 nm. Pode-se notar que o espectro apresenta uma maior intensidade de emissão com $\Delta\lambda$ igual a 00 nm, quando a varredura é feita imediatamente após a emissão, esta intensidade é reduzida drasticamente em $\Delta\lambda$ igual a 10 nm, seguido por reduções menos intensas em $\Delta\lambda$ igual a 30, 60 e 80 nm, havendo conseqüentemente uma redução da banda espectral e o aparecimento gradativo diretamente proporcional aos retardos de varredura de uma banda mais estreita e intensa na região de baixos comprimentos de onda com máximo de λ igual a 280 nm e uma banda mais alargada e menos intensa na região de altos comprimentos de onda com máximo de λ igual a 380 nm.

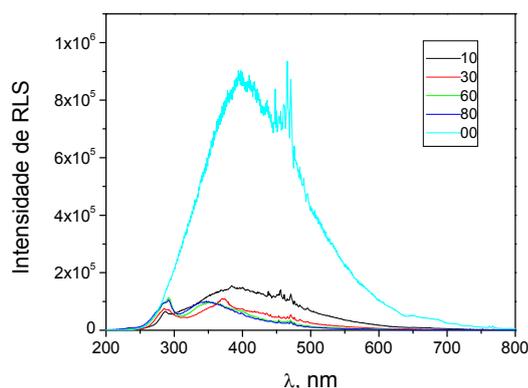


Fig.4 – Espectro de Fluorescência síncrona (RLS) da cerveja 100% pura (amostra D) com retardos de varredura ($\Delta\lambda$) de 00, 10, 30, 60 e 80 nm e abertura de fenda de 1 mm.

A figura 5 ilustra a intensidade de RLS em função da concentração das amostras A, B, C e D

(10%, 30%, 50% e 100% pura) respectivamente. Pode-se notar um maior espalhamento de RLS na cerveja pura (amostra D), demonstrando assim, que em maiores concentrações a emissão de fluorescência se apresenta mais intensa que em cervejas diluídas, uma vez que, apresentam conseqüentemente uma maior concentração de moléculas fluorescentes como aminoácido, vitaminas do complexo B, polifenóis e iso-ácidos.

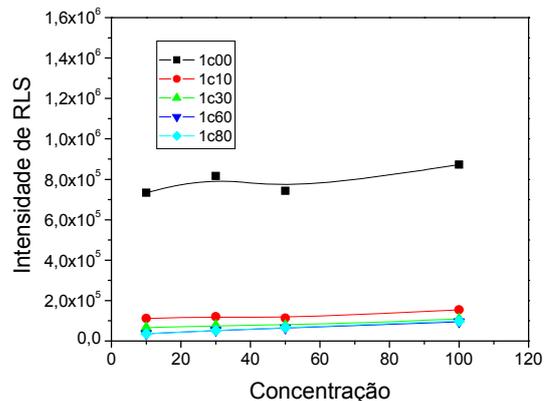


Fig.5 – Gráfico de intensidade em função da concentração das amostras A = 10%, B = 30%, C = 50% e D = 100% pura.

Conclusão

O espectro de fluorescência síncrona é um espectro característico de uma determinada amostra, podendo ser usado, por exemplo, em análise qualitativa na identificação da qualidade da cerveja monitorada ou com propósito de autenticação.

Mais análises e comparações espectrofluorimétricas serão necessárias para se efetuar as devidas aplicações e, conseqüentemente vários métodos estatísticos deverão ser aplicados.

Agradecimentos

Agradecemos ao suporte financeiro fornecido pela FAPESP (Projeto de auxílio a pesquisa 06/56701-3). A. Lima (IC) agradece ao CNPq pela bolsa concedida.

Referências

- ROMEO, J.; DIAZ, L.; GONZALES-GROSS, M.; WAERNBERG, J.; MARCOS, A.; Contribution to the intake of macro and micro nutrients exerted by moderate beer consumption, **Nutricion Hospitalaria** V. 21 n. 1, pag. 84-91, 2006.

- RAMANUJAM, N., Fluorescence spectroscopy in vivo. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, R. A. Meyers, Ed., John Wiley: Chichester, 2000.
- BAUNSGAARD, D.; ANDERSON, C. A.; ARNDAL, A. & MUNCK, L., Multi-way chemometrics for mathematical separation of fluorescent colorants and colour precursors from spectrofluorimetry of beet sugar and beet sugar thick juice as validated by HPLC analysis.- **Food Chemistry**, V. 70, pág. 113–121.
- LIU, X.; METZGER, L. E., Application of fluorescence spectroscopy for monitoring changes in nonfat dry milk during storage - **Journal of Dairy Science** V.90, n. 1, p. 24-37, 2007.
- LAKOWICZ, J. R., Protein Fluorescence, in: Lacowicz, J. R. (Ed.), Principles of Fluorescence Spectroscopy - **Plenum Press, New York**, 341–389, 1983.
- MAZEROLLES, G., DEVAUX, M. F., DUBOZ, G., DUPLOYER, M. H., MOUHOUS, RIOU N., DUFOUR, E., Infrared and Fluorescence Spectroscopy for Monitoring Protein Structure Changes During Cheese Ripening, **LAIT** 81 (4): 509-527 JUL-AUG 2001
- TUG SEZEN; Validación de las Simulaciones Computacionales de Plegamiento Proteico. Disponível em: <http://www.stanford.edu/group/pandegroup/folding/spanish/index.html>. Acessado em 07 de Fev de 2007.
- RAMANUJAM, N., Fluorescence spectroscopy in vivo. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**, R. A. Meyers, Ed., John Wiley: Chichester, 2000.
- LAKOWICZ, J. R., Principles of fluorescence spectroscopy, **Kluwer Academic / Plenum Publishers**: New York, 1999.
- Ewa Sikorska¹, Tomasz Górecki, Igor V. Khmelinskii, Marek Sikorski and Denis De Keukeleire, Fluorescence Spectroscopy for Characterization and Differentiation of Beers. **Journal Of The Institute of Brewing** V. 110, n. 4, p.: 267-275, 2004.
- Kuyter, M. G. M.; Dekker, M.; Modern Chromatographic Analysis of the Vitamins. **New York and Basel**, New York, p. 414.
- Korolkovas, A.; Burckhalter, J.; **Química Farmacêutica**. Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1982, p. 655-667.
- The United States Pharmacopéia - **The National Formulary** – USP-23, NF-18, 1995, p. 1379-1381.
- Official Methods of Analysis of The AOAC, 14^a ed., **Association of Official Analytical Chemists**, Inc., Arlington, 1984, p. 868,869.