



REVALIDAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE TEOR ALCOÓLICO EM CERVEJAS

Vinícius Castiholi Castanheira, Murilo Magalhães de Souza, Samarha Pacheco Wichello, Tarcísio Lima Filho, Luciano José Quintão Teixeira

Universidade Federal do Espírito Santo/Centro de Ciências Agrárias e Engenharias, Alto Universitário, s/nº - Guararema, Alegre - ES 29500-000, Brasil, viniciuscastiholi12@hotmail.com, murilomagalhaes2006@gmail.com, samarhapacheco@gmail.com, limafilhot@gmail.com, luqteixeira@yahoo.com.br.

Resumo - A revalidação de métodos de análise para determinação do teor alcoólico das cervejas tem ganhado importância devido ao crescimento do número de produtores artesanais e microcervejarias, assim como o seu elevado consumo. Este estudo teve como objetivo revalidar um método para determinação do teor alcoólico no laboratório LEQ 4 do CCAE-UFES. Neste trabalho foram consideradas as normas técnicas para análise de cervejas e revalidação de métodos de análises. Foram utilizadas soluções hidroalcoólicas com diferentes concentrações (solução padrão); amostras de cervejas artesanais, fortificadas com álcool absoluto e diluídas com água destilada. As metodologias de análises utilizadas foram: alcoometria, picnometria e refratometria; sendo avaliadas quanto a sua precisão, exatidão e linearidade. Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado com três repetições para soluções de diferentes concentrações, e para diferentes amostras de cervejas artesanais. O desempenho dos métodos variou entre os analitos, porém considerando o desempenho junto com a simplicidade no manuseio recomenda-se o método da alcoometria.

Palavras-chave: Cerveja. Teor Alcoólico. Análises.

Área do Conhecimento: Engenharias- Engenharia Química

Introdução

A cerveja é uma bebida carbonatada, produzida a partir do malte de cevada, do lúpulo, levedura e água. A sua produção consiste na moagem do grão, mosturação, filtração, fervura, fermentação, maturação, carbonatação, envase e pasteurização (AQUARONE, 2001). No contexto moderno, o considerável crescimento da indústria cervejeira nas vertentes de maior escala, assim como no ramo artesanal, resulta em um mercado competitivo que exige um aperfeiçoamento das técnicas de produção, assim como a devida padronização das análises, onde o objetivo é obter resultados confiáveis, o que auxilia na padronização do produto e o torna mais competitivo em um mercado com grande concorrência (NARDI, 2018).

A revalidação dos métodos de análises é um procedimento necessário para garantia da confiabilidade dos resultados gerados em cada laboratório. A revalidação do método e treinamento do técnico são ferramentas que podem garantir que o laboratório possua uma estrutura consistente para que os analistas possam executar os procedimentos com precisão, exatidão e linearidade necessária (ANVISA, 2003).

A precisão é definida como o grau de repetibilidade dos resultados das análises individuais, aplicados a uma mesma amostra e em condições homogêneas de ensaio (SOUZA, 2007). Já a exatidão é definida como a proximidade dos resultados do método analítico em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003). Um método atinge a linearidade, quando os seus resultados estão numericamente dentro da faixa de interesse, sendo os valores mais próximos aos limites superiores e inferiores desprezáveis. A linearidade é avaliada pelo coeficiente de correlação r . Para fins de confiabilidade dos resultados, é importante que as medições estejam dentro de uma faixa de resposta linear. Isso significa que para uma mudança de valores na variável, ou seja, ao executar um determinado método de análise, considerando tal variação, há uma proporcionalidade nos resultados obtidos. Essa proporcionalidade pode ser associada a uma equação de uma reta que resulta em uma linearidade (SOUZA, 2007).

Com a importância da confiabilidade e comparabilidade de resultados, diversos testes são realizados em laboratórios, sendo que estes devem tomar as medidas apropriadas que assegurem a capacidade de produzir os resultados esperados. Os métodos validados são baseados na norma ABNT NBR ISO 5725 (ABNT, 2018).



Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo revalidar um método de análise para determinação do teor alcoólico de cervejas artesanais no laboratório LEQ 4 do Centro de Ciências Agrárias e Engenharias da Universidade Federal do Espírito Santo.

Metodologia

O teor alcoólico foi analisado por três métodos: alcometria, picnometria e refratometria; em solução padrão (Tabela 1) e em amostras de cervejas (Tabela 2). As amostras foram descarbonatadas e destiladas (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008). Os parâmetros utilizados para aferir a revalidação do método foram linearidade, precisão e exatidão.

Foram preparados 100 mL de solução padrão utilizando água destilada e álcool (95,4 °GL) em diferentes concentrações conforme ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1– Amostras de soluções de referência hidroalcoólicas

Solução	Volume de álcool (mL)	Teor alcoólico (°GL)
1	1	0,99
2	3	2,98
3	5	4,98
4	7	6,97
5	9	8,96
6	11	10,95
7	13	12,94
8	15	14,93

Fonte: Os autores.

A solução padrão, em diferentes concentrações e em três repetições foi utilizada para aferir a precisão, exatidão e linearidade dos métodos testados.

Para calcular a linearidade em amostras de cervejas reais, utilizou-se uma cerveja do estilo Dortmund Export em concentração normal, diluída e fortificada com álcool (Tabela 2).

Tabela 2– Amostras de cervejas diluídas com água e concentradas com álcool

Amostra	Álcool (mL)	Água (mL)	Cerveja (mL)	Concentração teórica (°GL)
1	0	50	50	2,50
2	0	25	75	3,75
3	0	0	100	5,00
4	1	0	99	5,91
5	3	0	97	7,72
6	5	0	95	9,53
7	7	0	93	11,34

Fonte: Os autores.

Com os métodos revalidados, realizou-se uma aplicação, ou seja, a determinação do teor alcoólico em 3 tipos diferentes de cerveja sendo três tipos de cervejas artesanais: A1 (Dortmund Exporter); A2 (IPA); A3 (American Lager). Foram calculadas as médias do teor alcoólico nos diferentes estilos de cerveja, e a precisão conforme expresso na Tabela 3 dos resultados.

Todas as amostras de cerveja foram descarbonatadas e destiladas para a medição do teor alcoólico utilizando três metodologias: alcometria por meio de leitura direta um alcoômetro (0 a 40°GL); refratometria utilizando um refratômetro de bancada da marca ATAGO DR-A1 ABBE; e densidade relativa utilizando picnômetro e balança analítica sendo que o teor alcóolico nesse caso é obtido em tabela de densidade relativa x teor alcoólico. Todos os procedimentos foram feitos segundo INSTITUTO ADOLF LUTZ (2008).

Seguindo a recomendação da norma ABNT NBR ISO 5725, foi calculado o coeficiente de variação (CV) dos dados coletados para a avaliação da precisão (ABNT, 2018), conforme a Equação 1.



$$CV = (DP/CMD) \times 100 \quad (1)$$

onde DP é o Desvio padrão e CMD é a concentração média determinada

De acordo com a ANVISA, para que o método seja considerado preciso, os valores do CV devem ser inferiores a 5%. Quanto menor o coeficiente de variação, maior a precisão do método.

A exatidão dos métodos foi calculada pela Equação 2.

$$\text{Exatidão} = (C_m/C_t) \times 100 \quad (2)$$

onde C_m é a concentração média experimental e C_t é a concentração teórica.

Quanto mais próximo de 100%, melhor é a exatidão de um método, admitindo-se valores superiores e inferiores a esta porcentagem. Por exemplo, se a metodologia apresentou exatidão superior a 100%, significa que o valor medido está acima do valor teórico esperado, se a exatidão for inferior a 100%, significa que o valor medido está abaixo do valor teórico esperado.

A linearidade é definida pelo coeficiente de correlação linear (r) que é calculado pela raiz do coeficiente de determinação (r^2) gerado no gráfico, quanto mais próximo de 1 for o r melhor a curva padrão obtida. Para que um método seja considerado adequado, seu r deve ser superior a 0,99. No gráfico é gerado o seu coeficiente de determinação (r^2), portanto é calculado o coeficiente de correção (ANVISA, 2003).

Resultados

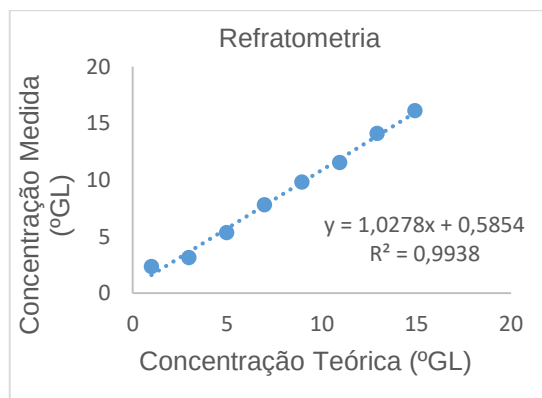
A partir das soluções preparadas conforme a Tabela 1 e com dados coletados de índice de refração medidos pelo refratômetro da solução padrão em diferentes concentrações em função do teor alcoólico teórico, foi possível ajustar um modelo conforme ilustrado na Equação 3. Este modelo foi usado para determinar a concentração de álcool por refratometria a partir da leitura do índice de refração das amostras destiladas.

$$y = 0,0005x + 1,3323 \quad (3)$$

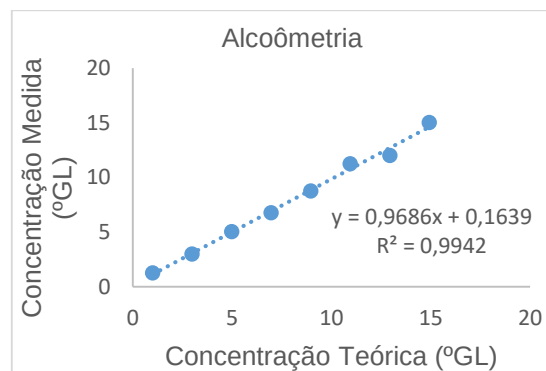
Onde y é o índice de refração e x é a concentração de álcool em °GL.

Na Figura 1, estão apresentados os gráficos (A, B e C) da concentração alcoólica média medida em função da concentração alcoólica teórica, para cada uma das três metodologias, a equação do modelo e o coeficiente de determinação médio (r^2). Além disso, está ilustrado a precisão média e a exatidão média para os três métodos (Figura 1 D).

- . Figura 1 –Concentração alcoólica média medida em função da concentração alcoólica teórica no (A) Refratômetro (B) Alcoômetro (C) Picnômetro ; (D) Média da precisão e exatidão para as três repetições de cada umas das metodologias: Alcoometria; Refratometria e Picnometria.



(A)

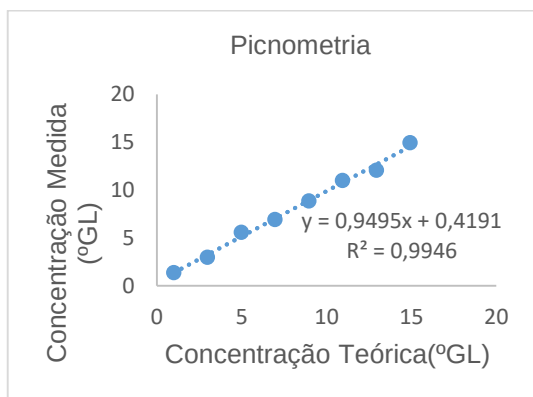


(B)

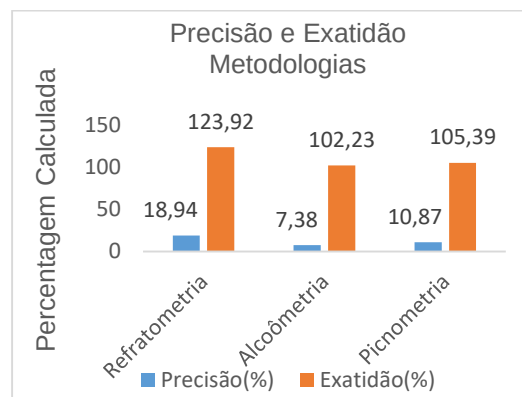


Site:
inicepg.univap.br
20 A 22 DE OUTUBRO

CIÊNCIA, SAÚDE E TECNOLOGIA:
AGENTES DE TRANSFORMAÇÃO E
CONSCIENTIZAÇÃO DA SOCIEDADE



(C)



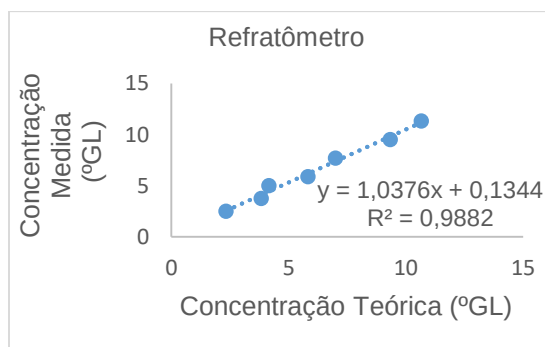
(D)

Fonte: Os autores.

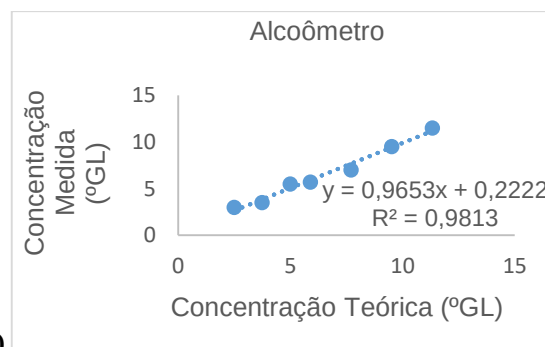
Analisando a Figura 1, é possível verificar que, para as soluções de referência, a refratometria apresentou um r^2 médio de 0,9938($r=0,9968$), precisão média de 18,94% e exatidão de 123,92%; A alcoometria apresentou um r^2 médio de 0,9942($r=0,9970$), precisão média de 7,38% e exatidão média de 102,23%; A picnometria apresentou r^2 médio de 0,9946($r=0,9973$), precisão média de 10,87% e exatidão de 105,39%.

Na Figura 2, estão apresentados os gráficos da concentração medida em função da concentração teórica das amostras de cervejas fortificadas e diluídas.

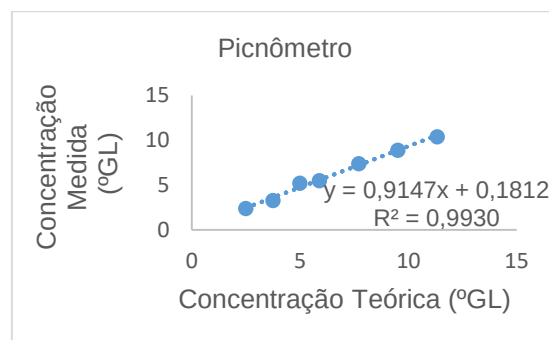
Figura 2 - Concentrações medidas em função da Concentração teórica das amostras de cervejas diluídas e fortificadas no (A) Refratômetro (B) Alcoômetro (C) Picnômetro ;



(A)



(B)



(C)

Fonte: Os autores.

Nas análises de cervejas fortificadas e diluídas, o r^2 do refratômetro foi de 0,9882($r=0,9940$), enquanto o alcoômetro apresentou 0,9813($r=0,9906$) e o picnômetro 0,9930($r=0,9965$).



Na Tabela 3 estão expressas as médias de teor alcoólico e precisão calculadas em 3 diferentes estilos de cervejas, por meio dos três métodos.

Tabela 3 – Comparação de Teor alcoólico dos métodos para diferentes cervejas artesanais

Método	Alcoometria		Picnometria		Refratometria	
Tipo Cerveja	Teor Alcoólico (°GL)	Precisão (%)	Teor Alcoólico (°GL)	Precisão (%)	Teor Alcoólico (°GL)	Precisão (%)
A ₁	4,50	3,85	4,80	7,3164	5,20	3,84
A ₂	5,00	5,77	5,30	9,8041	4,17	17,02
A ₃	4,00	1,44	4,60	11,2959	4,80	10,48
Média	-	3,68	-	9,47	-	10,44

A-Amostra

Fonte: Os autores.

Comparando as metodologias em diferentes estilos de cerveja; a alcoometria obteve a menor precisão média, de 3,68%, enquanto que a picnometria obteve uma precisão média de 9,47% e a refratometria obteve a maior precisão média, de 10,44%.

Discussão

Ao analisar-se os resultados da Figura 1, para soluções hidroalcoólicas, todos os métodos apresentaram coeficiente de correlação maiores que 0,99, portanto, a linearidade dos métodos está dentro do considerado ideal, a picnometria foi o método que apresentou maior valor de r (0,9973), sendo, portanto, a metodologia com maior linearidade para soluções hidroalcoólicas que apresenta a melhor proporcionalidade entre os resultados obtidos e a concentração teórica. Quanto a precisão e exatidão, a alcoometria apresentou o melhor resultado, com um CV de 7,38% e exatidão de 102,23%, avaliando a precisão, a alcoometria é a melhor metodologia quanto a variação das medições entre as repetições, porém o valor é superior ao 5%, preconizados pela ANVISA. Essa menor precisão pode ter ocorrido devido à pequenos erros experimentais. Já no que se refere a exatidão, o método da alcoometria foi o que apresentou valores mais próximo de 100%, o que indica maior exatidão.

Ao analisar-se os resultados da Figura 2, no que se refere as linearidades, todos os métodos apresentaram coeficiente de correlação maiores que 0,99; a picnometria foi o método que apresentou maior coeficiente ($r=0,9965$). Com isso o picnômetro é o equipamento que apresenta a melhor proporcionalidade entre os resultados obtidos e a concentração teórica das soluções diluídas e fortificadas.

Ao analisar-se os resultados da Tabela 3, para aplicação da revalidação do método de análise do teor alcoólico, a precisão para os três métodos aplicados aos três tipos de cervejas, o método que apresentou a melhor precisão foi a alcoometria, com um valor de CV médio de 3,68% sendo inferior ao 5% permitido pela ANVISA. Quanto menor for o coeficiente de variação (CV) mais preciso é o método.

Para pequenos produtores de cerveja artesanal e microcervejarias, o alcoômetro é o método mais indicado pois além da simplicidade e baixo custo ele apresentou menor variação entre os resultados obtidos.

Nas condições experimentais do estudo, o método da alcoometria foi preciso dentro do limite de 5% apenas em dois estilos de cervejas artesanais: A₁(Dortmund Exporter) e A₃(American Lager), enquanto a refratometria foi preciso em apenas um estilo: A₁(Dortmund Exporter).

Conclusão

Todo laboratório que deseja prestar serviços realizando análises físico-químicas de cerveja deve possuir um manual de análise revalidado. O analista deve fazer pré-testes e treinamento para executar as análises com precisão, exatidão e repetibilidade.

Os três métodos de determinação de teor alcoólico apresentaram linearidade e exatidão dentro dos limites aceitáveis, permitindo a escolha de qualquer um deles a depender das condições do laboratório, treinamento e preferência do analista. Porém, apenas os métodos de refratometria e de alcoometria



Site:
inicepg.univap.br
20 A 22 DE OUTUBRO

CIÊNCIA, SAÚDE E TECNOLOGIA:
AGENTES DE TRANSFORMAÇÃO E
CONSCIENTIZAÇÃO DA SOCIEDADE

apresentaram precisão dentro do limite aceitável. Assim, de acordo com os resultados e devido a maior simplicidade de manuseio e menor investimento, recomenda-se o método da alcoometria.

Referências

ABNT. Exatidão (veracidade e precisão) dos métodos e dos resultados de medição - Parte 1. ABNT, 2018. Disponível em: <<http://www.abnt.org.br/noticias/5883-exatidao-veracidade-e-precisao-dos-metodos-e-dos-resultados-de-medicao-parte-1>>. Acesso em: 08 Novembro 2020.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2003) Resolução RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2003/res0899_29_05_2003.html>. Acesso em: 03 Novembro 2020.

AQUARONE, W. B. S. D. A. L. E. **Biotecnologia Industrial** : Biotecnologia na Produção de Alimentos . 1. ed. São Paulo: BLUCHER, 2001. p. 4-6.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p.457-460.

NARDI, Renan Gustavo. **COMPORTAMENTO DO CONSUMIDOR: ANÁLISE DOS CONSUMIDORES DE CERVEJA ARTESANAL NAS CIDADES DE LAJEADO, ESTRELA E TEUTÔNIA/RS**. 2018. 57 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Administração de Empresas.) - Graduação, [S. l.], 2018.

SOUZA SVC **Procedimento para validação Intralaboratorial de métodos de ensaio: Delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. P.25. 2007