

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARCO AURELIO DAL SASSO

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA MOLECULAR DE
COMPOSTOS VOLÁTEIS E SEMIVOLÁTEIS EM PRODUTOS
CERVEJEIROS ALCOÓLICOS, SEM GLÚTEN E SEM ÁLCOOL

RIO DE JANEIRO
2023

Marco Aurelio Dal Sasso

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA MOLECULAR DE
COMPOSTOS VOLÁTEIS E SEMIVOLÁTEIS EM PRODUTOS
CERVEJEIROS ALCOÓLICOS, SEM GLÚTEN E SEM ÁLCOOL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química, Instituto de
Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gabriela Vanini Costa (IQ/UFRJ)

Rio de Janeiro

2023

CIP - Catalogação na Publicação

D136e Dal Sasso, Marco Aurelio
Estudo da composição química molecular de
compostos voláteis e semivoláteis em produtos
cervejeiros alcoólicos, sem glúten e sem álcool /
Marco Aurelio Dal Sasso. -- Rio de Janeiro, 2023.
107 f.

Orientadora: Gabriela Vanini Costa.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do
Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós
Graduação em Química, 2023.

1. Cerveja. 2. Cromatografia gasosa. 3.
Delineamento experimental. 4. Extração líquido
líquido. I. Vanini Costa, Gabriela , orient. II.
Título.

Marco Aurelio Dal Sasso

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA MOLECULAR DE
COMPOSTOS VOLÁTEIS E SEMIVOLÁTEIS EM PRODUTOS
CERVEJEIROS ALCOÓLICOS, SEM GLUTEN E SEM ALCOÓL

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química,
Instituto de Química, Universidade Federal do Rio
de Janeiro, como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Ciências.

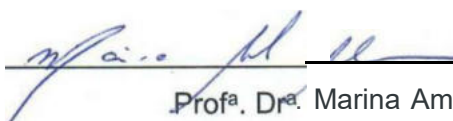
Aprovado por:



Prof^a. Dr^a. Gabriela Vanini Costa (IQ/UFRJ)



Prof^a. Dr^a. Monica Costa Padilha (IQ/UFRJ)



Prof^a. Dr^a. Marina Amaral Alves (IPPN/UFRJ)

AGRADECIMENTOS

A Prof^a. Dr^a. Gabriela Vanini Costa, pela oportunidade, incentivo, pela valiosa e indispensável orientação durante todas as etapas desta dissertação.

As Professoras membros da banca: Prof^a. Dr^a. Mônica Costa Padilha e a Prof^a. Dr^a. Marina Amaral Alves por aceitarem participar da banca examinadora deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Débora de Almeida Azevedo por todo apoio e compreensão. A minha mãe Maria Auxiliadora pelo amor, compreensão, paciência, incentivo e apoio. Sem você ao meu lado teria sido muito mais difícil.

Ao meu irmão Juninho, que mesmo de longe sempre me apoiou.

Aos meus tios, tias, primos e primas. Que me ajudaram em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amigos e amigas: Thiago, Glauco, Henrique (Lesk), Bandeira, Paulinho, Marcos, Elisa, Carolina, Priscila, Yris, Fernandinha, Eloísa e Mariana Figueiredo, por todos os momentos de descontração. Vocês foram fundamentais.

As doutoras, Gleicielle e Daniela França pelo apoio científico.

Um agradecimento especial à doutora Raquel pelo companheirismo, conselhos, horas de almoço e pelas contribuições dadas a esse trabalho.

Um agradecimento especial a doutora Ananda por toda atenção, carinho e dedicação. Sua contribuição foi fundamental para a conclusão desse trabalho. O meu muito obrigado.

A Joyce por ter sido minha companheira durante essa caminhada.

Aos colegas Vânia e Felipe Costa do LACONQ pelas palavras de apoio.

A toda equipe de alunos, alunas, técnicos, técnicas e doutoras do LAGOA – NAF pelo suporte e momentos de descontração. E um agradecimento especial a Thamara, Vinícius e Karen por dividirem o dia-dia comigo desde sempre. E não poderia faltar nosso companheiro Carlos Bulchi.

A todos colaboradores do LADETEC, secretaria, limpeza e manutenção.

Aos meu sobrinhos e sobrinhas Bento, Enzo, Chiara, Mariah e Aurora por dar sentido a tudo.

Por fim, a todos os meus professores por todo o ensinamento e aprendizado.

RESUMO

DAL SASSO, Marco Aurelio. **Estudo da composição química molecular de compostos voláteis e semivoláteis em produtos cervejeiros alcoólicos, sem glúten e sem álcool.** Rio de Janeiro, 2023. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas no mundo. Sua composição química, rica em compostos voláteis e semivoláteis (e.g. aldeídos, álcoois e ésteres), é a principal responsável por suas características sensoriais. Recentemente, a demanda por cervejas sem álcool ou sem glúten tem aumentado, motivada por questões sociais e de saúde. Neste estudo foi desenvolvido um método analítico para obtenção do perfil químico molecular de compostos voláteis e semivoláteis de cervejas, a fim de comparar os diferentes produtos cervejeiros e estabelecer a diferença entre estes, através de marcadores químicos. Para isso foram empregadas ferramentas de Delineamento Experimental (DoE) na avaliação das condições de análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e para extração de compostos voláteis e semivoláteis pelo método de extração líquido-líquido assistida por dessalgamento. O método desenvolvido foi empregado para comparar 5 marcas de cervejas nacionais, das quais 3 possuíam o produto com e sem álcool e 2 o produto alcoólico com e sem glúten. O ajuste dos parâmetros cromatográficos demonstrou que os fatores avaliados não influenciaram significativamente nos resultados analíticos, mas evidenciaram a robustez do método. O método otimizado permitiu a detecção de 31 compostos. A análise estatística das amostras reais possibilitou a identificação de 5 marcadores químicos capazes de distinguir de acordo com sua presença e ausência de álcool e glúten. Por fim, a utilização da CG-EM, aliada à estatística (DoE), constituem ferramentas valiosas para obter informações do perfil químico molecular da cerveja, sendo de grande importância para Indústria cervejeira.

Palavras-chave: Cerveja, Cromatografia gasosa, Delineamento experimental, Extração líquido-líquido.

ABSTRACT

DAL SASSO, Marco Aurelio. **Estudo da composição química molecular de compostos voláteis e semivoláteis em produtos cervejeiros alcoólicos, sem glúten e sem álcool.** Rio de Janeiro, 2023. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023

Beer is one of the most consumed beverages in the world. Its chemical composition, rich in volatile and semi-volatile compounds (e.g. aldehydes, alcohols and esters), is primarily responsible for its sensory properties. Recently, the demand for non-alcoholic or gluten-free beers has increased due to social and health issues. In this study, an analytical method was developed to obtain molecular chemical profiles of volatile and semi-volatile compounds in beers in order to compare different brewing products and detect the difference between them through chemical markers. To do this, Experimental Design (DoE) tools were used to assess the analysis conditions by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and to prescribe volatile and semi-volatile compounds by the desalination-assisted liquid-liquid generation method. Using the developed method, five national beer brands were compared, three of which had the alcoholic and non-alcoholic product and two had the alcoholic product with and without gluten. The adjust of the tested chromatographic parameters, i.e. the evaluated factors did not significantly influence the analytical results, but showed the robustness of the method. The optimized method enabled the detection of 31 compounds. The statistical analysis of the real samples allowed the identification of 5 chemical markers capable of distinguishing between the presence and absence of alcohol and gluten. Finally, the use of GC-MS in combination with statistics (DoE) are valuable tools to obtain information about the molecular chemical profile of beer, which is of great importance for the brewing industry.

Keywords: Beer, Gas chromatography, Experimental design, Liquid-liquid extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Nuvem de palavras com as 50 mais citadas (título, abstract e palavras-chave) nas publicações relacionadas à cerveja entre 2020-2023 nas áreas de “Química”, “Engenharia” e “Tecnologia de alimentos”.....	18
Figura 2 - Mapa da contribuição científica por país entre 2020-2023, demonstrada a partir da intensidade de cor, com a temática <i>Beer</i> , <i>Gluten free beer</i> , e <i>non alcoholic beer</i>	19
Figura 3 - Fatos históricos relevantes	20
Figura 4 - Produção anual de cerveja em milhões de hectolitros (hL) entre os anos de 2008-2022.....	22
Figura 5 - Etapas de produção da cerveja.	23
Figura 6 - Planta da cevada	24
Figura 7 - Corte longitudinal do grão da cevada: Aristo, camada de aleurona, casca da semente, escutelo, micrópila, embrião, casco, endosperma amiláceo	25
Figura 8 - Etapas de processamento da cevada para a produção do malte a ser utilizado na produção de cerveja.....	26
Figura 9 - Malte de cevada.....	27
Figura 10 - A) Flores de lúpulo fêmea B) Lúpulo em <i>pellet</i>	28
Figura 11 - Cones de fermentação	29
Figura 12 - Resumo das reações de Maillard.....	34
Figura 13 - Representação de um sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.....	44
Figura 14 - Gráfico de Pareto para a otimização das condições cromatográficas.	58
Figura 15 - Superfície de resposta da interação entre os parâmetros temperatura do injetor e temperatura do forno (A) e vazão do gás de arraste e taxa de variação da temperatura do forno (B).....	59
Figura 16 - Cromatograma da mistura de padrões nas condições otimizadas do método cromatográfico.	61
Figura 17 - Gráfico de Pareto para otimização da extração líquido-líquido (ELL).	63
Figura 18 - Gráfico da superfície de resposta da interação entre a quantidade de sal (g) e a proporção solvente:amostra (mL).....	64
Figura 19 - TIC e regiões expandidas – Marca 1 alcoólica.....	67
Figura 20 - TIC e regiões expandidas – Marca 1 não alcoólica.....	68
Figura 21 - TIC e regiões expandidas – Marca 2 alcoólica.....	69

Figura 22 - TIC e regiões expandidas – Marca 2 não alcoólica.....	70
Figura 23 - TIC e regiões expandidas – Marca 3 alcoólica.....	71
Figura 24 - TIC e regiões expandidas – Marca 3 não alcoólica.....	72
Figura 25 - TIC e regiões expandidas – Marca 4 alcoólica e com glúten.	73
Figura 26 - TIC e regiões expandidas – Marca 4 alcoólica e sem glúten.	74
Figura 27 - TIC e regiões expandidas – Marca 5 alcoólica e com glúten	75
Figura 28 -TIC e regiões expandidas – Marca 5 alcoólica e sem glúten	76
Figura 29 - Gráfico de pizza das diferentes classes químicas presentes no perfil químico cervejeiro e suas porcentagens.....	77
Figura 30 - TIC comparativo entre os perfis das cervejas com e sem álcool da Marca 2, sendo 1) 2-metilpropan-1-ol; 2) etanoato de isopentila; 4) 3-metilbutan-1-ol; 23) 2- feniletanol.....	81
Figura 31 - Comparação dos CIE (m/z 60) referente aos ácidos orgânicos da Marca 1, sendo 11) ácido acético; 15) ácido butanoico; 17) ácido 2-metilbutanoico; 22) ácido hexanoico; 26) ácido octanoico; 29) ácido decanoico.	82
Figura 32. Comparação dos CIE (m/z 60) referente aos ácidos orgânicos da Marca 2 sendo 11) ácido acético; 15) ácido butanoico; 17) ácido 2-metilbutanoico; 22) ácido hexanoico; 26) ácido octanoico; 29) ácido decanoico.	83
Figura 33 - Comparação dos CIE (m/z 60) referente aos ácidos orgânicos da Marca 3, sendo 11) ácido acético; 13) ácido 2-metilpropanoico; 15) ácido butanoico; 17) ácido 2- metilbutanoico; 22) ácido hexanoico; 26) ácido octanoico; 29) ácido decanoico.	84
Figura 34 - TIC comparativo entre os perfis das cervejas com e sem glúten da Marca 4 sendo 1) 2-metilpropan-1-ol; 4) 3-metilbutan-1-ol; 23) 2-feniletanol.	85
Figura 35 - TIC comparativo entre os perfis das cervejas com e sem glúten da Marca 5 sendo 1) 2-metilpropan-1-ol; 4) 3-metilbutan-1-ol; 23) 2-feniletanol.	85
Figura 36 - Similaridade de perfil químico analisado através de Dendograma da análise hierárquica de agrupamentos (HCA) – método de Ward com distância euclidiana para amostras de cervejas comerciais alcoólica com glúten, alcoólica sem glúten e sem álcool.....	86
Figura 37 - Análise de componentes principais, gráfico <i>score vs loadings</i>	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estilo de cerveja e suas respectivas leveduras utilizadas no processo de fermentação.....	28
Tabela 2 - Faixa de temperatura e tempo de fermentação para os diferentes estilos de cervejas (ALVES, GONÇALVES, <i>et al.</i> , 2020, SEO, KIM, <i>et al.</i> , 2020).	29
Tabela 3 - Composição da cerveja. Adaptado de (BUIATTI, 2008).	31
Tabela 4 - Características sensoriais de alguns compostos relevantes na formação do aroma e sabor da cerveja	33
Tabela 5 - Comparação dos custos de instalação, custos operacionais, rendimento e qualidade da cerveja final entre os principais processos utilizados e suas associações para obtenção da cerveja sem álcool. Adaptado de (MULLER, NEVES, <i>et al.</i> , 2020).....	39
Tabela 6 - Matriz de planejamento para otimização do método de extração	53
Tabela 7 - Matriz de planejamento para otimização de método de análise instrumental por CG-EM.....	55
Tabela 8 - Parâmetros instrumentais da análise por CG-EM.....	56
Tabela 9 - Descrição das amostras comerciais utilizadas no estudo.....	56
Tabela 10 - Parâmetros cromatográficos obtidos após a otimização por DoE .	61
Tabela 11 - Parâmetros da extração líquido-líquido obtidos após a otimização por DoE.....	65
Tabela 12 - Lista de compostos identificados e seus tempos de retenção	65
Tabela 13 - Média da concentração relativa ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$) dos compostos identificados para cada uma das marcas comerciais avaliadas (numeradas de 1 a 5)	78

LISTA DE ESQUEMAS

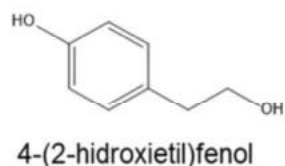
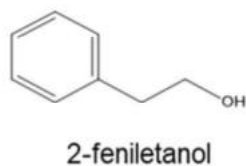
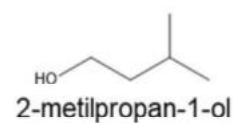
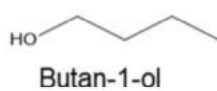
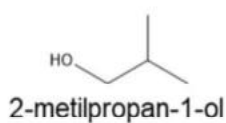
Esquema 1 - Métodos de remoção do álcool em produtos cervejeiros.	37
Esquema 2 - Esquema dos processos empregados na produção de cerveja sem glúten	41

LISTA DE SIGLAS

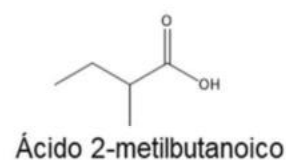
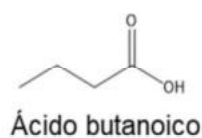
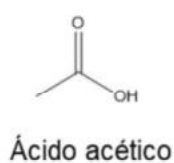
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CSA	Cerveja sem álcool
CBTA	Cervejas com baixo teor alcoólico
DoE	Delineamento experimental (do inglês, <i>design of experiments</i>)
EIC	Cromatograma de íons extraídos (do inglês, <i>Extracted Ion Chromatogram</i>)
ELL	Extração Líquido-Líquido
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês, <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
HCA	Análise Hierárquica de Agrupamentos
HMF	5-(hidroximetil) furan-2-carbaldeído
LADETEC	Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico
MEFS	Micro Extração em Fase Sólida
MTBE	Metil-terc-butil éter
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês, <i>National Institute of Standards and Technology</i>)
PCA	Análises de Componentes Principais
PEP	Prolilendopeptidase
TIC	Cromatograma de íons totais (do inglês, <i>Total Ion Chromatogram</i>)

ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS PRINCIPAIS SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS

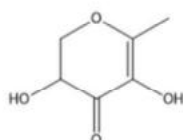
Álcoois



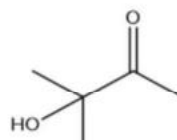
Ácidos Carboxílicos



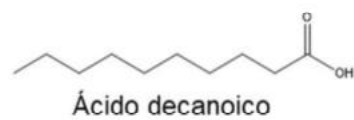
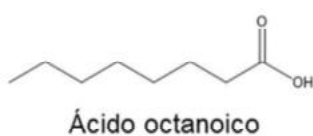
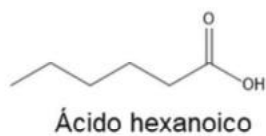
Pirona



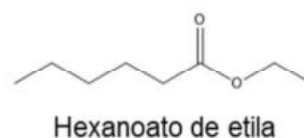
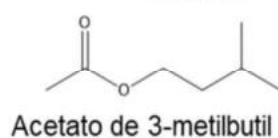
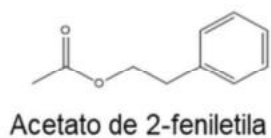
Hidroxi cetona



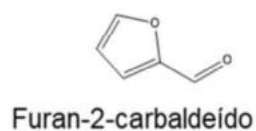
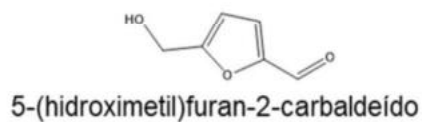
Ácidos Graxos



Ésteres



Aldeídos



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 CERVEJA.....	17
2.1.1 Breve histórico.....	19
2.2 PADRÕES DE CONSUMO E PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	21
2.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL.....	23
2.3.1 Brassagem.....	24
2.3.2 Fermentação.....	28
2.3.3 Maturação.....	30
2.3.4 Filtração.....	31
2.4 A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CERVEJA.....	31
2.4.1 Perfil de compostos voláteis e semivoláteis.....	32
2.5 PROCESSOS DE REMOÇÃO DO ÁLCOOL EM CERVEJAS.....	36
2.5.1 Método biológico.....	37
2.5.2 Método físico.....	38
2.6 PROCESSO DE REMOÇÃO DO GLÚTEN EM CERVEJAS.....	40
2.6.1 Matérias-primas alternativas: cereais livres de glúten e pseudocereais.....	41
2.6.2 Prospecção tecnológica na remoção do glúten da cerveja.....	42
2.7 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA.....	43
2.7.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....	44
2.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	46
2.9 ANÁLISE MULTIVARIADA.....	47
3 JUSTIFICATIVA.....	49
4 OBJETIVOS.....	51
5 EXPERIMENTAL.....	52
5.1 MATERIAL E AMOSTRAS.....	52
5.2 PADRÕES ANALÍTICOS.....	52
5.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO.....	53

5.4 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA.....	54
5.4.1 Otimização da análise cromatográfica	55
5.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS	56
5.5.1 Tratamento de dados	57
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
6.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO POR CG-EM.....	58
6.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL).....	62
6.3 ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO MOLECULAR DAS AMOSTRAS COMERCIAIS	65
6.4 ANÁLISE MULTIVARIADA	86
7 CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS.....	91
APÊNDICE I	98
APÊNDICE II.....	108

1 INTRODUÇÃO

Considerada uma das bebidas mais consumidas mundialmente, a cerveja é uma bebida fermentada de baixo teor alcoólico, que tem como características mais marcantes o sabor amargo e a refrescância (DUCRUET *et al.*, 2017). Além disso, a cerveja é uma fonte de vitaminas (e.g. vitaminas B6 e B12) , minerais (e.g. magnésio) e antioxidantes (e.g. 4-hidroxifeniletíl álcool) que proporcionam benefícios à saúde (SALANȚĂ *et al.*, 2020). Por ser uma das bebidas mais consumidas do mundo é também uma das mais populares, inclusive no Brasil, onde o clima tropical favorece a preferência pelo consumo do estilo Pilsen. Atualmente o país está entre os principais produtores e consumidores de cerveja do mundo (BARTHHAAS, 2022).

O consumo moderado de cerveja é considerado um hábito relacionado a questões de sociabilização, visto que em muitas ocasiões essa bebida é utilizada como ferramenta de inclusão social, proporcionando ao consumidor sensação de bem-estar e euforia. Entretanto, as consequências negativas relacionadas ao seu consumo passaram a envolver questões de aspectos legais, de saúde e de mercado (MULLER *et al.*, 2020; SALANȚĂ *et al.*, 2020).

As restrições ao consumo de cerveja, seja por questões legislativas (leis federais 11.705/08 e 12.760/12, conhecidas como “leis secas”), religiosas ou de saúde, como, por exemplo, pessoas com doença celíaca (doença autoimune causada pela intolerância ao glúten), gestantes, diabéticos, pessoas com problemas cardiovasculares, fez com que a indústria cervejeira, por meio de abordagens inovadoras de fabricação de cerveja, em termos de ingredientes, métodos de fabricação e tipo de fermentação, desenvolvesse produtos para atender essa parcela de consumidores (BRÁNYIK *et al.*, 2012; KERPEŠ; FISCHER; BECKER, 2017; SALANȚĂ *et al.*, 2020).

Entre os métodos existentes para a produção de cervejas sem álcool, há os métodos biológicos, cujos processos buscam controlar a produção de etanol; e os métodos físicos, cuja remoção do etanol se dá em etapa posterior à fermentação (BRÁNYIK *et al.*, 2012; SENKARCINOVA *et al.*, 2019). Ainda para a remoção do glúten são utilizados processos enzimáticos durante a etapa de brasagem (RUBIO-FLORES; SERNA-SALDIVAR, 2016). Os casos de remoção do etanol têm sido criticados por tornar a qualidade do produto inferior quando

comparado ao produto alcoólico, especialmente pela falta de sabor e aromas agradáveis característicos da cerveja (OLMO *et al.*, 2014). Entretanto, estas comparações são baseadas em testes organolépticos que estão sujeitos a subjetividades e fatores biológicos (VALENTIN *et al.*, 2007). O mesmo não ocorreria para as cervejas sem glúten, preparadas por meio do uso de enzimas sobre as mesmas matérias-primas da cerveja tradicional, pois seu processo de remoção não estaria ligado aos compostos aromáticos presentes na cerveja.

Sendo assim, a caracterização química da cerveja através da utilização de técnicas analíticas, como por exemplo a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), pode complementar as análises sensoriais de modo a atenuar as questões subjetivas envolvidas nos testes organolépticos. Além disso, o conhecimento do perfil químico de voláteis e semivoláteis das cervejas sem glúten e sem álcool pode auxiliar na melhoria dos métodos de produção no sentido de obter produtos cada vez mais semelhantes ao seu similar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CERVEJA

De acordo com o artigo 36 da seção III do capítulo VII do Decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009 que regulamenta a Lei nº 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, a cerveja é definida como

Cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro.

A cerveja é uma bebida carbonatada composta por 2-6% de extrato residual sólido, 2-6% de etanol, 0,35-0,50% de CO₂ e 90-95% de água (ROSA; JÚLIO CARLOS AFONSO, 2014). Adjuntos cervejeiros são produtos capazes de aumentar a concentração de compostos bioativos e conferir novas características organolépticas à cerveja. Esses produtos podem ser tanto cereais (com exceção do malte), quanto extratos vegetais. Os cereais usados como adjunto cervejeiro podem ser grãos como milho e arroz, que servem como fonte adicional de amido para a fermentação. Esses adjuntos podem compor até 45% da composição total da cerveja, segundo a legislação brasileira (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2009). Com relação aos extratos vegetais eles podem ser utilizados para incrementar a doçura e aromaticidade da cerveja, como é o caso do melado de cana (YANG *et al.*, 2022). Porém, há de se ressaltar que esses adjuntos não podem ser de origem animal como o mel (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2009; RUBIO-FLORES; SERNA-SALDIVAR, 2016).

A **Figura 1** apresenta uma bibliometria, em formato de “WordCloud” (Nuvem de Palavras) construída a partir do banco de dados *Web of Science* (Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, Estados Unidos), usando os termos “Beer”, “Gluten free beer”, e “non alcoholic beer”, com auxílio do programa “RStudio”, das 50 palavras de maior destaque (título, abstract e palavras-chave) nas produções científicas dos últimos 3 anos (período entre 2020-2023). Essa

A partir do mesmo conjunto de dados, a **Figura 2** apresenta um mapa construído com os países que mais participaram na produção dos trabalhos relacionados às análises de produtos cervejeiros e suas tecnologias nos últimos três anos (2020-2023), destacados por diferentes tons de azul (quanto mais

intensa é a coloração azul do país, maior é a sua contribuição). As linhas vermelhas destacam as colaborações entre os países. Ao observar o mapa de contribuição científica podemos perceber que a quantidade de trabalhos publicados nos últimos três anos (3565 artigos científicos) evidencia a importância dessa bebida no contexto global. As regiões que mais se destacam são América do Norte, América do Sul, Ásia e Europa. Nessas regiões estão localizados os cinco maiores produtores de cerveja: EUA, China, Alemanha, México e Brasil.

Figura 2 - Mapa da contribuição científica por país entre 2020-2023, demonstrada a partir da intensidade de cor, com a temática *Beer*, *Gluten free beer*, e *non alcoholic beer*.



Fonte: *Web of Science* e programa *RStudio*.

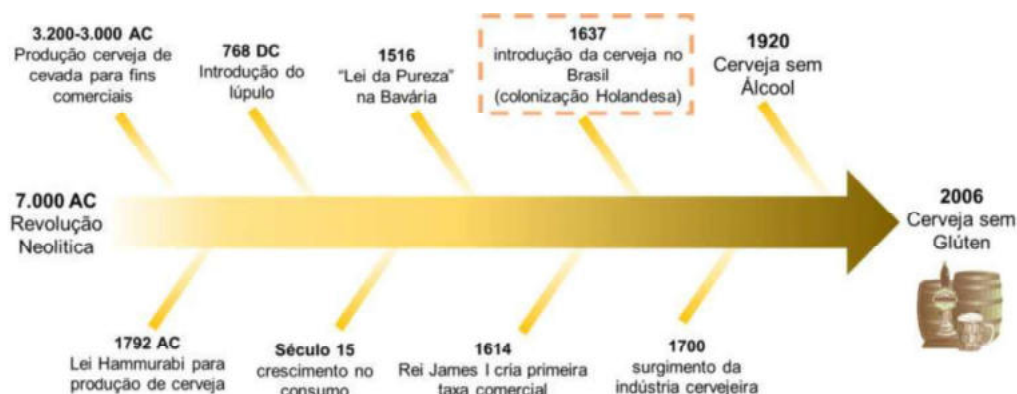
As regiões com que o Brasil mantém o maior número de colaborações são América do Norte e Europa, com destaque para baixa colaboração com a China, visto que esses países são importantes parceiros comerciais e se destacam tanto na produção de cerveja, quanto na produção científica sobre o tema. Com base nesse cenário, o estudo realizado reforça a relevância do trabalho.

2.1.1 Breve histórico

A palavra cerveja pode estar relacionada a duas origens. Uma delas do latim *cerevisia*, referente a Ceres, deusa romana da agricultura. A outra de *bibere*

também do latim, que significa beber, e deu origem à palavra inglesa *beer* (OETTERER; R, 2006). A origem da bebida remonta do ano 7000 AC, época em que ocorreu a revolução Neolítica (**Figura 3**). Antes disso, ainda não surgiram evidências arqueológicas de sua criação.

Figura 3 - Fatos históricos relevantes.



Aproximadamente em 3.200 a 3.000 AC, houve os primeiros registros de que a fabricação de cerveja era parte importante da economia dos estados sumérios. Em 1792 a 1750 AC o rei Hammurabi, governante da Babilônia, introduziu um código de punições a respeito de todos os aspectos da vida cotidiana, conhecido como “Código de Hammurabi”, e quatro deles dizem respeito à cerveja. Isso destaca a importância da produção e comercialização da cerveja para época (HORNSEY, 2003).

Outra lei viria a ser criada em 1516 na Bavária e ficou conhecida como “Lei de pureza da Baviera”. Esta foi uma das primeiras medidas de proteção da qualidade, decretando que apenas malte, lúpulo e água deveriam ser usados na fabricação de cerveja (o fermento foi adicionado posteriormente) (HORNSEY, 2003). No Brasil, a cerveja foi introduzida em 1637 através da colonização holandesa. Até então, o território brasileiro era ocupado pelos portugueses e o hábito de consumir cerveja não era uma característica daquele povo, pois o vinho figurava como sua bebida favorita. Devido a isso, até o ano de 1637, o consumo de cerveja não tinha sido difundido no território brasileiro (SANTOS, 2004).

Um dos estilos mais consumidos no Brasil, o estilo ‘Pilsner’, surgiu em 1842, quando o cervejeiro alemão, Josef Groll, foi nomeado cervejeiro-chefe da

Civic Brewery em Plzen. Esse estilo se mostrou extremamente popular e modelo para cerca de 95% das cervejas atuais (HORNSEY, 2003). Atualmente, no Brasil, a cerveja é regida pelo Decreto nº 6.871 de 4 de junho de 2009, que regulamenta a lei nº 8.918 de 14 de julho de 1994, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2009).

Com passar do tempo, os efeitos intoxicantes ocasionados pelo consumo de álcool tornaram-se menos desejáveis, embora a cerveja continuasse um produto muito apreciado, ela não poderia mais conter álcool. A origem das cervejas sem álcool (CSA) aconteceu durante o período da “Lei Seca” dos EUA entre 1920 e 1933. Nesse período, as cervejarias americanas foram proibidas de fabricar cerveja sendo obrigadas a alterar a cadeia produtiva para focar em outros produtos que utilizassem o mesmo tipo de estrutura fabril e procedimentos operacionais. Entre os produtos produzidos pelas cervejarias da época estavam corantes, extratos de malte e uma nova bebida à base de malte, denominada “*near beer*”, que continha menos de 0,5% de álcool, e por isso sua produção era permitida naquela época (MULLER *et al.*, 2020).

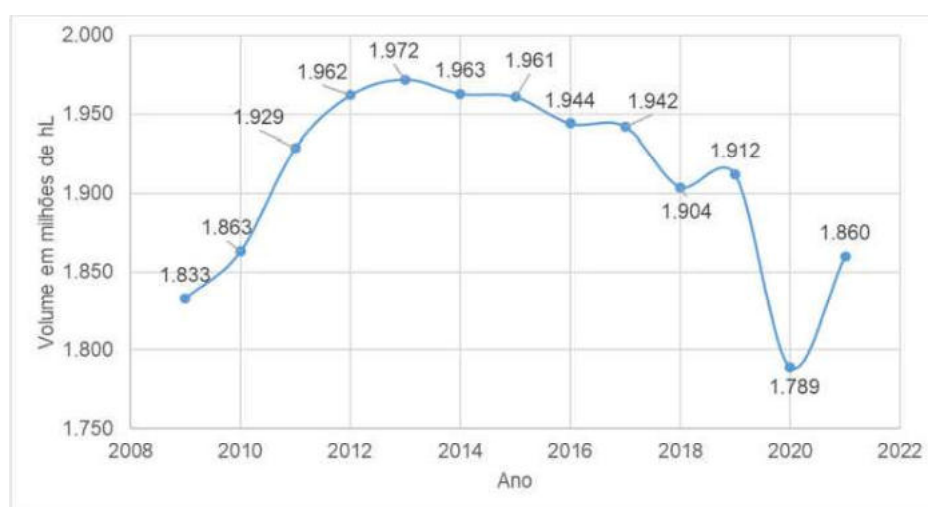
Outro fato importante na história da indústria cervejeira foi o surgimento das cervejas livres de glúten. Na década de setenta do século XX, a dieta livre de glúten foi introduzida como tratamento para pacientes com doença celíaca, sendo utilizada como estratégia de tratamento até os dias atuais. Visto que cerca de 1,4% da população global apresenta intolerância ao glúten, a indústria alimentícia passou a desenvolver alimentos sem glúten. A indústria de bebidas alcoólicas acompanhou essa tendência iniciando a produção em escala industrial em 2006 (HAGER *et al.*, 2014; RUBIO-FLORES; SERNA-SALDIVAR, 2016).

2.2 PADRÕES DE CONSUMO E PRODUÇÃO DE CERVEJA

No passado a cerveja, ao lado de outras bebidas alcoólicas, foi em muitas sociedades uma parte fundamental da vida cotidiana, bem como parte integrante das práticas rituais e da expressão da identidade social, cultural e das relações intergrupais (HORNSEY, 2003; JIAO *et al.*, 2011; VIVIAN *et al.*, 2016). Atualmente esses fatores de interação social ainda permanecem sendo utilizados como mecanismo de socialização (WHO, 2023).

A cerveja é a terceira bebida mais consumida no mundo sendo superada apenas pela água e pelo chá (SALANȚĂ *et al.*, 2020). Essa popularidade pode ser relacionada à quantidade produzida nos últimos anos (**Figura 4**). Fazendo um recorte das últimas décadas podemos observar que a partir de 2009 houve um aumento na produção mundial de cerveja atingindo o seu ápice em 2013 quando o volume chegou a 1.972 milhões de hL (1hL= 100L). Entre o período de 2014 a 2019 houve um leve declínio na produção, atingindo um volume médio de 1.938 milhões de hL (BARTHHAAS, 2022). Em 2020 ocorreu uma queda acentuada na produção. Esse declínio está relacionado à pandemia de COVID- 19, a qual ocasionou uma desaceleração da economia global devido às medidas de distanciamento/isolamento social e fechamento de fronteiras, reduzindo drasticamente a produção da cerveja no mundo.

Figura 4 - Produção anual de cerveja em milhões de hectolitros (hL) entre os anos de 2008-2022.



Adaptado de (BARTHHAAS, 2022)

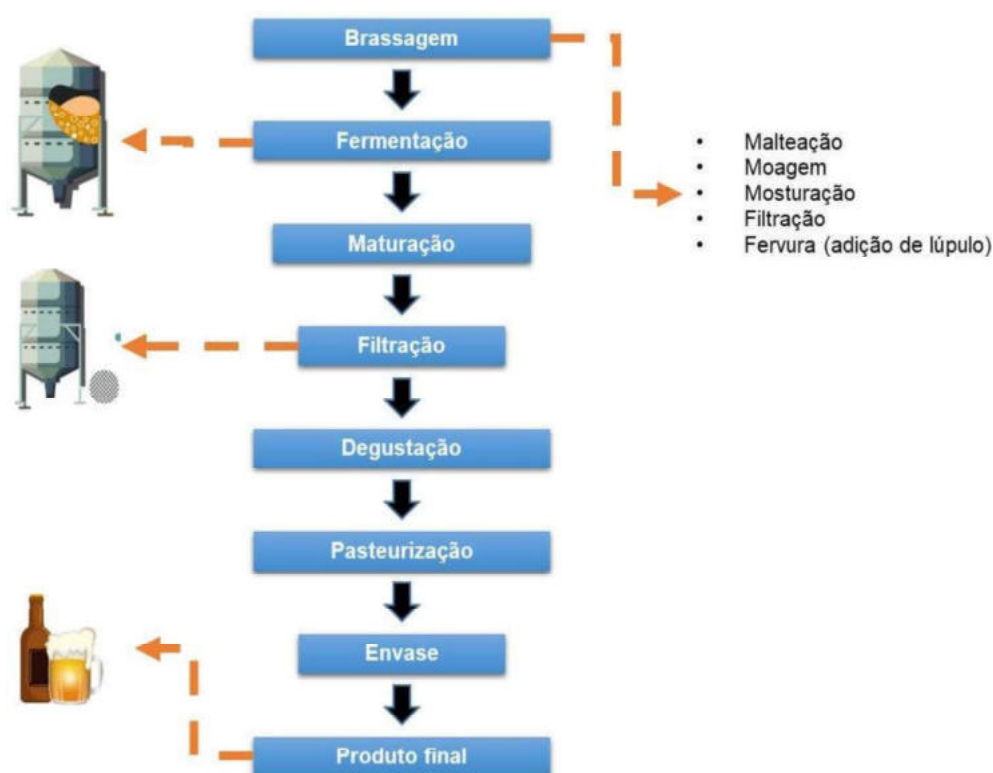
O Brasil se destaca como grande produtor de cerveja desde o início do século XX (1913/14), quando a produção em território nacional foi de 700 mil hL (FRANCE; AMERIEA, 1914). Já no início do atual século, no ano de 2020, foram produzidos 151,9 milhões de hL de cerveja no Brasil, cerca de 7,1 milhões de hL a mais que 2019, apesar da crise causada pela pandemia de COVID-19. Atualmente o país figura entre os cinco maiores produtores de cerveja ao lado dos EUA, China, Alemanha e México. Esses países são responsáveis pela

produção de mais da metade do volume mundial de cerveja (BARTHHAAS, 2022).

2.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL

A produção da cerveja envolve sete etapas principais, que são: brasagem, fermentação, maturação, filtração, degustação, pasteurização e envase, **Figura 5** (VANDERHAEGEN, NEVEN, *et al.*, 2006; ALVES, GONÇALVES, *et al.*, 2020). Dependendo do tipo de matéria-prima e do processo empregados a cerveja irá assumir características sensoriais e físico-químicas específicas (e.g., coloração, sabor e teor alcoólico) (ANDERSON *et al.*, 2021).

Figura 5 - Etapas de produção da cerveja.



A legislação brasileira (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2009) permite a substituição parcial e a adição de outras matérias-primas, como por exemplo grãos, maltados ou não, adição de adjuntos cervejeiros (e.g. carboidratos de origem vegetal, aromatizantes e condimentos). Dentre esses destacam-se como os

mais utilizados o xarope de maltose de milho e os *gritz* de milho e de arroz (VIVIAN *et al.*, 2016). Além disso, também podem ser utilizadas leveduras especiais para fabricação de cervejas com baixo teor alcoólico (SALANȚĂ *et al.*, 2020). Estas práticas são utilizadas para minimizar os custos relativos ao malte e na fabricação de cervejas especiais.

2.3.1 Brassagem

A etapa da brassagem consiste nos seguintes processos: maltagem, secagem, moagem, filtração, fervura (esterilização e adição do lúpulo) e resfriamento. Ao final desse processo é obtido o mosto cervejeiro que está pronto para receber as leveduras (SALANȚĂ *et al.*, 2020).

Cevada: a cevada é composta de uma única semente de forma alongada constituída por casca, pericarpo, endosperma e gérmen, **Figura 6**. O grão de cevada tem um sulco no lado frontal (ventral) onde cresce contra o caule. Esse grão é coberto com conchas lenhosas entrelaçadas chamadas cascos, uma na frente e outra atrás; nas costas o casco se estende para formar uma ala característica, também chamada de barba. Sob os cascos tem uma casca de semente cerosa. Abaixo da casca da semente há uma camada de células vivas chamada camada de aleurona. Existe um buraco no revestimento da semente, chamado micrópila, onde os cascos se encontram no final do grão, longe da marquise (BARTH, 2016).

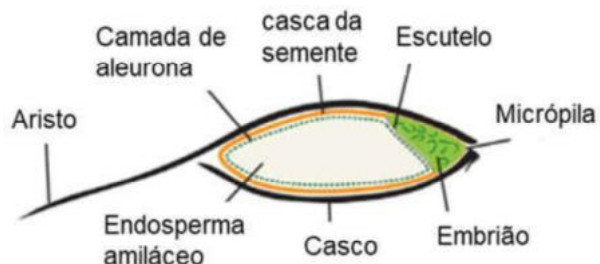
Figura 6 - Planta da cevada.



Fonte: BARTH, 2016

A micrópila e o embrião estão nesta extremidade do grão. O compartimento que contém o embrião é separado de um compartimento que contém amido, chamado endosperma, por um divisor chamado escutelo. O endosperma contém grânulos de amido, cada um rodeado por uma capa de proteína. A **Figura 7** representa o corte longitudinal do grão da cevada, onde pode-se observar as partes do grão de cevada (BARTH, 2016).

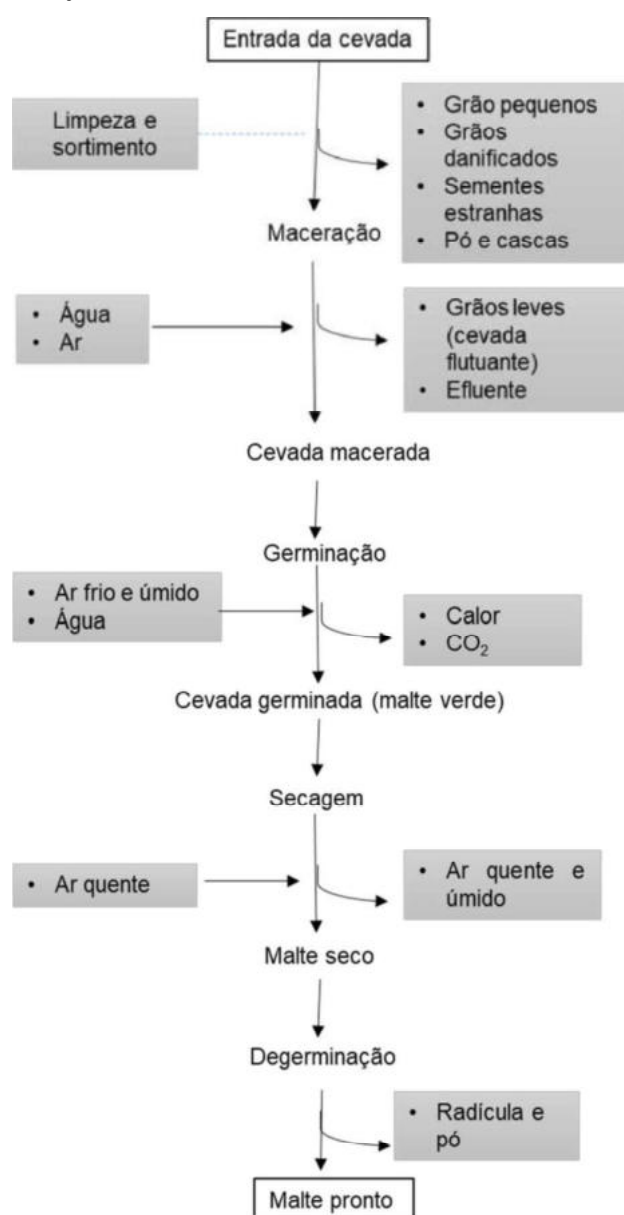
Figura 7 - Corte longitudinal do grão da cevada: Aristo, camada de aleurona, casca da semente, escutelo, micrópila, embrião, casco, endosperma amiláceo.



Fonte: BARTH, 2016

Malteação: refere-se ao início da produção de enzimas hidrolíticas durante a germinação, como por exemplo as enzimas que atuam na quebra do amido (α -amilase e β -amilase), das paredes celulares (β -glucanases) e das proteínas (carboxipeptidases e endopeptidases) (**Figura 8**). A atividade enzimática é interrompida na etapa de secagem dos grãos, que pode ocorrer a temperaturas variando de 85 °C a mais de 200 °C, dependendo do sabor e cor do malte desejado (VIVIAN *et al.*, 2016).

Figura 8 - Etapas de processamento da cevada para a produção do malte a ser utilizado na produção de cerveja.



Secagem: Nesta etapa ocorre a retirada da umidade e o processo de germinação é interrompido, tornando o grão estável o que auxilia na conservação do malte. Ainda nessa etapa, também são removidos compostos voláteis que podem contribuir para o surgimento de sabores desagradáveis no produto final. Após a secagem o malte já está pronto (**Figura 9**) para ser utilizado na produção do mosto cervejeiro.

Figura 9 - Malte de cevada.



Fonte: BARTH, 2016

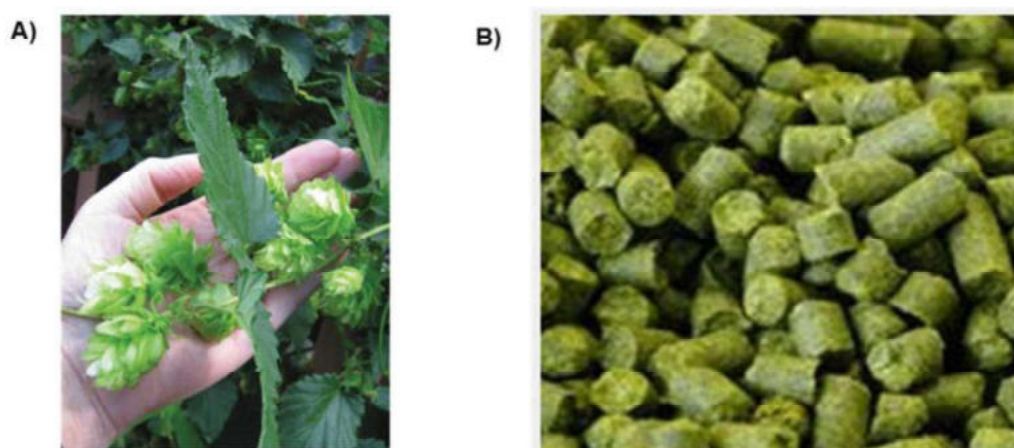
Moagem dos grãos maltados: a moagem esmaga as sementes, quebrando o endosperma em pequenos pedaços e liberando-o da casca e tegumento para que haja bastante contato com a água durante a maceração. Nesta etapa é importante manter a casca intacta, pois ela auxilia na separação do mosto, e porque cascas em pó podem dar à cerveja um sabor áspero ou uma aparência turva. A trituração é feita com um a três pares de rolos em um dispositivo chamado moinho. O espaço entre os rolos define o tamanho das partículas. Para tornar o malte suscetível ao ataque enzimático ele é triturado e aquecido para gelatinizar o amido (VANDERHAEGEN *et al.*, 2006; VIVIAN *et al.*, 2016).

Preparação do mosto: o mosto é o resultado da quebra das moléculas de amilose e amilopectina em pequenos açúcares, como maltose e glicose. O mosto também é rico em proteínas solúveis, peptídeos e aminoácidos, elementos importantes na estabilidade e qualidade de cerveja (VIVIAN *et al.*, 2016). Não há uma definição exata dos intervalos e temperatura na produção do mosto, que é uma característica de cada cerveja e varia de acordo com o resultado desejado. No entanto, quatro faixas de temperatura podem ser definidas para o processo, com base na faixa de ativação enzimática, conforme segue (MORADO, 2009):

- 40 - 45 °C: Ativação enzimática das enzimas β -glucanase.
- 50 - 55 °C: Proteólise.
- 60 - 72 °C: Ação da α e β -amilase.
- 76 - 78 °C: Inativação enzimática.

Fervura do mosto e a adição do lúpulo: O processo de fervura serve a muitos propósitos. Este processo também é importante para a extração de ácidos α e β do lúpulo (**Figura 10**), responsáveis pelo amargor, sabor e ação antisséptica da cerveja. No entanto, é igualmente importante controlar os níveis de constituintes de sabor no mosto, porque eles podem ter um grande impacto na estabilidade do sabor da cerveja. Devido à alta temperatura (90 °C) durante a fervura, causando os seguintes efeitos: esterilização do mosto, inativação, evaporação da água (concentração do mosto) e coagulação das proteínas (DE SCHUTTER *et al.*, 2008; MONGELLI *et al.*, 2015).

Figura 10 - A) Flores de lúpulo fêmea B) Lúpulo em *pellet*.



Fonte: BARTH, 2016

2.3.2 Fermentação

O processo de fermentação é a fase em que os açúcares são convertidos em álcool. É nessa etapa que ocorre a diferenciação entre os tipos de cerveja que serão produzidas a depender do tipo de levedura utilizada (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Estilo de cerveja e suas respectivas leveduras utilizadas no processo de fermentação.

Estilo de cerveja	Tipo de levedura
Lager	<i>Sacharomyces calsbergensis</i>
Ale	<i>S. cerevisae</i>
Lambic	leveduras presentes na atmosfera

A temperatura e o tempo de fermentação também têm um papel importante na qualidade da cerveja, visto que esses parâmetros influenciam a atuação das leveduras perante ao mosto. As informações sobre faixa de temperatura e tempo de fermentação para cada estilo de cerveja estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Faixa de temperatura e tempo de fermentação para os diferentes estilos de cervejas (ALVES *et al.*, 2020a; SEO *et al.*, 2020).

Estilo de cerveja	Faixa de temperatura (°C)	Tempo de fermentação (dias)
Lager	7-14	15
Ale	18-25	7
Lambic	Temperatura ambiente	730

Essa fase depende de muitos mecanismos celulares, sendo influenciada por outros fatores como temperatura, pH, oxigênio dissolvido, agitação, disponibilidade de açúcares e outros nutrientes, a presença de contaminantes e taxa de inoculação (ROMANO *et al.*, 2003; BAMFORTH, 2017; CAPECE *et al.*, 2018). Tal etapa de fermentação ocorre em vasos chamados de cone de fermentação (**Figura 11**).

Figura 11 - Cones de fermentação.



Fonte: BARTH, 2016.

Durante o processo, os açúcares mais simples são fermentados primeiro, seguindo a ordem: glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose (PALMER, 2006). Quando a fase estacionária da fermentação começa, a maioria das leveduras são removidas e a maturação começa. O fermento restante promove dois efeitos: aumentar a produção de dióxido de carbono e remoção de compostos indesejáveis, como diacetil, acetaldeído e sulfeto de ácido (CIÊNCIAS, ICB, *et al.*, 2011; SILVELLO, 2019). Além disso, esta fase visa iniciar a clarificação da cerveja (sedimentação das células de levedura) e manter a cerveja no estado reduzido, evitando a oxidação durante o armazenamento.

2.3.3 Maturação

O processo de maturação, que pode também ser chamado de fermentação secundária, se inicia quando todo o açúcar fermentável se esgota, a fermentação diminui e a levedura começa a sair da suspensão, dando início ao processo de floculação. A maior parte da levedura pode então ser separada do produto, que, a partir dessa etapa, pode ser de fato reconhecido como cerveja. Entretanto, a cerveja fresca precisa passar por um processo de maturação, pois ainda contém compostos indesejáveis, tais como o acetaldeído e o diacetil. Esses subprodutos são provenientes de processos oxidativos e podem ser reduzidos pelas poucas células de levedura remanescentes (ALVES *et al.*, 2020).

Durante a maturação, os álcoois saturados ou de cadeia mais longa (e.g. 2-metilpropan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol e hexan-1-ol) e os ácidos graxos (e.g. ácido butanoico, ácido hexanoico e ácido decanoico) não se alteram significativamente. No entanto, outros ésteres, tais como o acetato de etila, acetato de isoamila, caprilato e caproato de etila, aumentam de concentração (VIVIAN *et al.*, 2016). Depois da maturação, a cerveja segue para ser envasada. Antes do envase, o resíduo de fermento restante pode ser removido e a cerveja é então resfriada e pode ser filtrada.

2.3.4 Filtração

Após o estágio de maturação, a cerveja segue para a sala de filtração, onde passa por filtros especiais revestidos com terra de diatomáceas, para remover partículas em suspensão e desarticular potenciais formadores de turbidez (estabilização). Essa etapa é importante para preservar a cerveja para que não ocorram alterações visíveis a longo prazo e a cerveja mantenha sua aparência original (EßLINGER, 2009).

Nessa etapa pode ser adicionado extrato de lúpulo tetra-hidro isomerizado, comumente referido como tetrahop, que é normalmente utilizado após a filtração final. Esta solução aquosa alcalina de sais de potássio de tetrahidro-iso- α -ácidos aumenta a espuma da cerveja e a protege da formação de sabores leves. Finalmente, a cerveja é envasada em garrafas, latas ou barris, e pasteurizada para preservar o caráter do produto até o seu consumo.

2.4 A COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CERVEJA

A cerveja contém centenas de compostos, dentre eles água, sais minerais, carboidratos, polifenóis, aminoácidos, ácidos graxos, óleos essenciais, aldeídos, cetonas, ésteres, vitaminas, proteínas (glúten) e compostos sulfurados (**Tabela 3**). A água representa mais de 90% da composição química da cerveja, sendo que, os únicos compostos presentes com concentração superior a 1 g L^{-1} são alguns carboidratos não fermentados, etanol, dióxido de carbono e glicerol.

Tabela 3 - Composição da cerveja. Adaptado de (BUIATTI, 2008).

Composto	Concentração	Número de compostos	Fonte ou agente
Etanol	0,237- 0,395 g L^{-1}	1	Fermento; malte
Carboidratos	10-60 g L^{-1}	~100	Malte
Dióxido de carbono	3,5-4,5 g L^{-1}	1	Fermento; malte
Sais inorgânicos	0,5-4 g L^{-1}	~25	Água; malte
Nitrogênio total	0,3-1 g L^{-1}	~100	Fermento; malte
Ácidos orgânicos	0,05-0,25 g L^{-1}	~200	Fermento; malte
Álcoois (C>2)	0,1-0,3 g L^{-1}	~80	Fermento; malte

Composto	Concentração	Número de compostos	Fonte ou agente
Aldeídos	0,03-0,04 g L ⁻¹	~50	Fermento; malte
Ésteres	0,025-0,04 g L ⁻¹	~150	Fermento; malte; lúpulo
Compostos sulfurados	0,001-0,01 g L ⁻¹	~100	Fermento; malte; lúpulo
Vitamina B e derivados	0,005-0,01 g L ⁻¹	13	Fermento; malte
Glúten	0,020 g L ⁻¹	1	Malte

A cerveja é uma bebida complexa que contém cerca 800 compostos orgânicos, e como muitos desses estão em concentração baixa (ng µL⁻¹), apenas aqueles que atuam ativamente na formação do sabor podem ter influência nas características sensoriais, tais como paladar e olfato. Os compostos químicos presentes na cerveja têm origem nas matérias-primas (maltes, lúpulo e água) ou são provenientes dos subprodutos do metabolismo das leveduras, que são formados durante a etapa de fermentação (**Tabela 3**). Esses compostos são responsáveis pelo sabor característico da cerveja (BUIATTI, 2008; ROSA; JÚLIO CARLOS AFONSO, 2014).

2.4.1 Perfil de compostos voláteis e semivoláteis

Os atributos sensoriais das cervejas estão associados aos compostos voláteis e semivoláteis (**Tabela 4**), como por exemplo, o feniletil álcool que possui aroma adocicado e de rosas e o benzaldeído que tem cheiro de amêndoas, amêndoas amargas e caroço de cereja. Outro exemplo interessante é o do 3-metilbutan-1-ol (álcool isoamílico) que possui gosto de banana. Podemos citar também compostos voláteis que são produzidos durante o envelhecimento da cerveja, como é o caso do furfural, que é produto das reações de Maillard. Essas reações ocorrem quando há torra do malte, durante a fervura do mosto e durante o tempo de prateleira (termo utilizado no comércio para designar o tempo de vida útil de um produto perecível. Pode ser, por exemplo, o período de tempo no qual o alimento apresenta e conserva as características organolépticas que o caracterizam).

Tabela 4 - Características sensoriais de alguns compostos relevantes na formação do aroma e sabor da cerveja.

Composto	Aroma característico	Referência
Aldeídos		
acetaldeído	Floral, adocicado, frutado	(BRÁNYIK <i>et al.</i> , 2008)
3-metilbutanal	Frutado, amendoado, torrado, maltado, herbal	(BETTENHAUSEN <i>et al.</i> , 2018)
nonanal	Gorduroso, cítrico, frutado, floral, ceroso, doce, lavanda	(BETTENHAUSEN <i>et al.</i> , 2018)
Álcoois		
3-metilbutan-1-ol	Uísque, malte, queimado, pungente	(ATTCHELOUWA <i>et al.</i> , 2020)
2-feniletanol	Mel, doce, fermento, floral, picante, ervas, rosa	(ATTCHELOUWA <i>et al.</i> , 2020)
butan-1-ol	rançoso, doce	(OLANIRAN <i>et al.</i> , 2017)
Ésteres		
hexanoato de etila	Frutado, maçã ácida, morango, anis, goma de vinho, doce	(ALVES <i>et al.</i> , 2020b)
acetato de 3-metilbutila	Frutado, banana	(ATTCHELOUWA <i>et al.</i> , 2020)
acetato de 2-feniletila	Doce, fermento, floral, picante, herbal, rose, whiskey,	(BETTENHAUSEN <i>et al.</i> , 2018)
octanoato de etila	Frutado, maçã ácida, gorduroso, floral, verde, anis, doce	(ALVES <i>et al.</i> , 2020b)
Ácidos		
ácido acético	azedo, vinagre, pungente	(BRÁNYIK <i>et al.</i> , 2008)
ácido hexanoico	Pungente, queijo, cabra, rançoso	(ALVES <i>et al.</i> , 2020b)
ácido octanoico	Queijo, gorduroso, fresco, musgo, pungente,	(BETTENHAUSEN <i>et al.</i> , 2018)

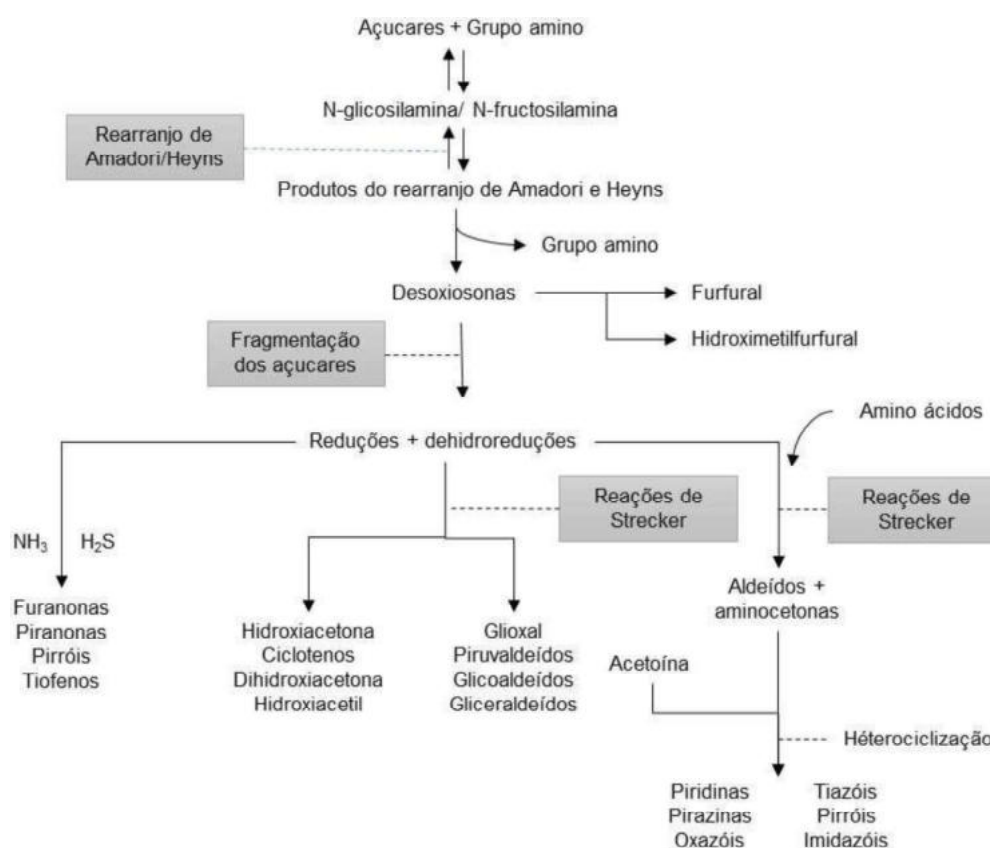
O furan-2-carbaldeído (furfural), assim como outros produtos provenientes dessa reação podem ser utilizados como marcadores de envelhecimento (VANDERHAEGEN *et al.*, 2007; BETTENHAUSEN *et al.*, 2018).

A reação de Maillard é de particular interesse, pois os produtos gerados estão relacionados ao sabor e ao valor nutricional dos alimentos, o que inclui a

cerveja. A reação de Maillard pode ser dividida em três etapas (**Figura 12**). A etapa inicial começa com a reação de condensação entre aminoácidos e

açúcares redutores, formando os chamados produtos de Amadori/Heyns. Na segunda etapa, ocorre uma reação de hidrólise ácida destes produtos, liberando os grupos aminos e formando desoxiosonas. A partir das desoxiosonas ocorre uma reação de ciclização formando o furfural e o HMF proveniente de pentoses e hexoses, respectivamente. Na terceira etapa ocorrem reações de desidratação, fragmentação, ciclização e polimerização, nas quais estão envolvidos os aminoácidos e as desoxiosonas. Nessa última etapa podemos destacar a reação de Strecker, que pode ser resumida na reação de oxidação de aminoácidos a seus aldeídos correspondentes (VAN BOEKEL, 2006; VANDERHAEGEN *et al.*, 2007; HO; ZHENG; LI, 2015).

Figura 12 - Resumo das reações de Maillard.



Adaptado de (VAN BOEKEL, 2006)

O perfil químico de voláteis e semivoláteis do produto cervejeiro vai depender da matéria-prima utilizada, dos processos aos quais esses materiais

são submetidos e das condições de armazenamento. Como por exemplo, a hexan-3-ona que pode ser encontrada apenas no mosto; o etanol, que é produzido durante a etapa de fermentação; e o acetaldeído oriundo da oxidação do etanol, que ocorre durante o envelhecimento da cerveja (VANDERHAEGEN *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2019; ALVES *et al.*, 2020).

A complexidade do perfil de compostos voláteis e semivoláteis aumenta durante as etapas de fabricação, sendo que a maioria desses compostos serão produzidos a partir da etapa de fermentação. Isso ocorre, pois nessa etapa é onde os açúcares são metabolizados pelas leveduras gerando álcoois e outros compostos como ácidos carboxílicos, resultando em um perfil volátil mais rico (ALVES *et al.*, 2020).

Ao longo da etapa de fermentação são formados aldeídos, ácidos graxos e furanos, estando presentes apenas em determinadas etapas da fermentação, de acordo com as variações de temperatura do processo fermentativo (7 a 14°C) (ALVES *et al.*, 2020). Dentre os compostos referentes a essas classes de substância, podemos destacar: o acetaldeído, que é encontrado durante a etapa de fermentação e na etapa de maturação; o furfural, que é formado pela reação de Maillard; e a concentração, em termos de porcentagem relativa ao total de ácido graxos, que atinge o máximo de concentração no final do processo de fermentação, e dentre os mais abundantes podemos citar o ácido octanoico que possui 78% do total de ácidos graxos, seguido do ácido hexanoico (13%) e do ácido decanoico (9%) (ALVES *et al.*, 2020).

Durante a etapa de maturação a concentração de etanol se sobrepõe às dos outros compostos orgânicos voláteis. Seguindo a etapa de maturação, o processo de filtração é marcado pela diminuição dos ésteres alifáticos. Após a filtração outros aditivos alimentares podem ser adicionados à cerveja (e.g.: extrato de lúpulo) que são utilizados para realçar as características organolépticas e que podem influenciar no perfil químico de compostos voláteis e semivoláteis do produto final. De modo geral, os constituintes majoritários do produto final das cervejas tradicionais são o álcool etílico, acetato de isoamila, 3-metilbutan-1-ol, octanoato de etila e o hexanoato de etila (ALVES *et al.*, 2020).

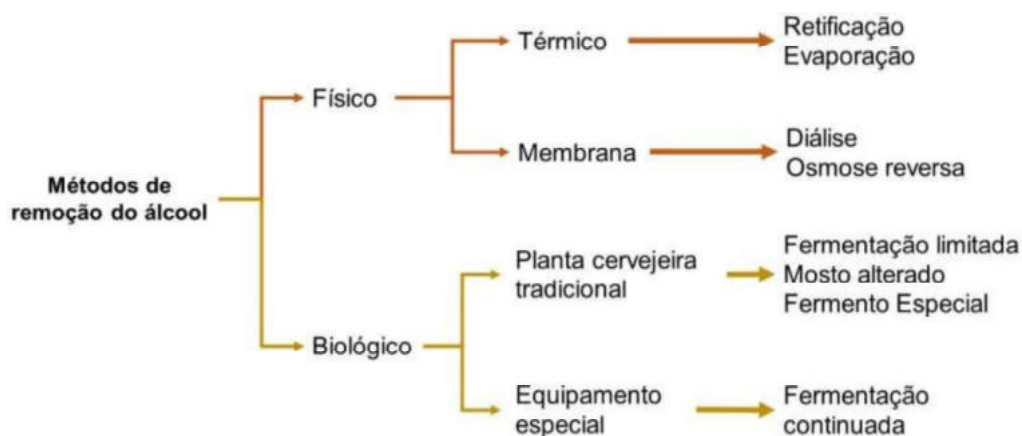
2.5 PROCESSOS DE REMOÇÃO DO ÁLCOOL EM CERVEJAS

Desde que foi desenvolvida, a produção de cerveja sem ou com teor alcoólico baixo chegou até o final do século XX sem que houvesse muitas inovações. Os métodos aplicados à sua produção foram, principalmente, a restrição da formação de álcool por meio de fermentações interrompidas ou incompletas (BRIGGS *et al.*, 2004; KUNZE, 2010).

Na maioria dos países da União Europeia (UE), as cervejas com teor alcoólico baixo são divididas em cervejas sem álcool (CSA), menores ou iguais a 0,5% v/v de etanol, e as cervejas com baixo teor alcoólico (CBTA), que não possuem mais que 1,2% v/v de etanol. Nos Estados Unidos da América (EUA), cerveja sem álcool deve apresentar no máximo 0,5% v/v de etanol (BLANCO; ANDRÉS-IGLESIAS; MONTERO, 2016). A legislação brasileira é semelhante à dos EUA e da UE, em que o teor alcoólico em bebidas fermentadas não alcoólicas, não pode ser superior a 0,5% v/v de etanol (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2009).

Nos últimos 20 anos, a crescente demanda por produtos com teor alcoólico baixo, paralelamente à disponibilidade de novas tecnologias e materiais, possibilitaram o desenvolvimento de processos inovadores de fabricação de cerveja sem álcool. Os métodos conhecidos para obtenção de cerveja sem álcool podem ser divididos em dois grandes grupos: *i*) restrição da formação de etanol (método biológico); *ii*) remoção de etanol (método físico) (**Esquema 1**). Esses métodos também são conhecidos como métodos de pré- produção e pós- produção, todos possuindo suas vantagens e desvantagens (MULLER *et al.*, 2020).

Esquema 1 - Métodos de remoção do álcool em produtos cervejeiros.



2.5.1 Método biológico

Em geral, nos processos biológicos de obtenção cerveja sem álcool, o mosto não é completamente fermentado, seja com interrupção da fermentação, fermentação a frio ou uso de microrganismos seletivos com maior afinidade para partes específicas do mosto. O produto final geralmente tem uma característica sensorial mais adocicado, característico de mosto aprimorado, e cor mais viva. A maior vantagem dos processos biológicos em relação aos processos físico-químicos é que, na maioria das vezes, não há necessidade de instalação de equipamentos adicionais na planta industrial para a extração do álcool (MULLER *et al.*, 2020; SALANȚĂ *et al.*, 2020).

O método de fermentação limitada pode ser considerado a abordagem mais simples de produzir cervejas com teor alcoólico baixo, pois utiliza os mesmos equipamentos utilizados no método tradicional de fermentação do mosto cervejeiro, o que representa uma vantagem na adaptação de uma planta cervejeira em operação. Esse método pode ser empregado através da utilização de leveduras que realizam uma fermentação parcial do mosto, pela retirada das leveduras (por filtração ou centrifugação), ou interrompendo o processo fermentativo por resfriamento rápido a 0 °C. As desvantagens deste método decorrem do fato de que o tempo necessário para a fermentação não é suficiente para promover uma conversão adequada do mosto em cerveja, o que resulta em

um produto final pobre em compostos aromáticos e com forte característica de mosto. Geralmente, as falhas sensoriais do produto final são corrigidas por inibição do teor de oxigênio do mosto, fermentação a uma temperatura mais alta e a adição de aromas (MULLER *et al.*, 2020; SALANȚĂ *et al.*, 2020).

A fermentação fria de contato ou processo de contato a frio utiliza os mesmos equipamentos tradicionalmente utilizados na fermentação da cerveja, com o diferencial de que toda a fermentação é realizada em baixas temperaturas (0 – 5 °C). Uma característica importante desse método é que a levedura reduz os compostos carbonílicos do mosto, o que permite a produção de compostos aromáticos. Entretanto, essas leveduras podem converter aminoácidos em aldeídos que contribuem para a formação de sabores desagradáveis. Em geral, as cervejas não alcoólicas fermentadas a frio apresentam características semelhantes às cervejas comuns (MULLER *et al.*, 2020; SALANȚĂ *et al.*, 2020; SOHRABVANDI *et al.*, 2010).

A utilização de leveduras especiais para produção de cerveja com teor alcoólico baixo compreende uma diversidade de espécies, como por exemplo: *Saccharomyces rouxii* spp, *Saccharomyces ludwigii*, *Lactobacillus* spp e *Saccharomyces pastorianus*. Dependendo da levedura utilizada, a composição química da cerveja pode ser alterada além do teor alcoólico, como é o caso da *S. rouxii*, que é incapaz de fermentar maltose (principal açúcar do mosto), no entanto, tem capacidade de fermentar a frutose e a sacarose, gerando um menor teor de etanol e um alto teor de extrato residual com aumento na proporção de glicerol e álcoois de açúcar no produto final (SALANȚĂ *et al.*, 2020; SOHRABVANDI *et al.*, 2010).

2.5.2 Método físico

Os métodos físicos de remoção do etanol podem ser divididos em três grandes grupos: *i)* tratamento térmicos; *ii)* extração; *iii)* e separação por membranas. Esses métodos possuem vantagens e desvantagens que estão relacionadas à qualidade do produto final e aos custos da instalação de equipamentos específicos (MULLER *et al.*, 2020; SALANȚĂ *et al.*, 2020).

Os processos térmicos de remoção do etanol da cerveja geralmente alteram sensorialmente o produto final, com perda de aroma, corpo,

carbonatação e sabor, bem como alterações no perfil aromático, com intensificação de aromas indesejáveis. Os métodos atualmente utilizados são evaporação a vácuo, destilação a vácuo e destilação por centrifugação. Esses processos possuem características específicas, tais como a utilização de temperaturas altas e perda significativa de compostos voláteis, como é o caso da evaporação a vácuo. Por outro lado, o processo de destilação a vácuo é capaz de recuperar os compostos aromáticos voláteis que são novamente adicionados em uma etapa posterior do processo (tanque de recombinação). As temperaturas aplicadas a esse método podem variar entre 0 e 45 °C devido à utilização de vácuo. Estes processos térmicos são capazes de produzir cervejas com teor alcoólico em torno de 0,05% v/v (MULLER *et al.*, 2020; SALANȚĂ *et al.*, 2020).

Sendo assim, foi possível observar diferentes maneiras de remover o etanol e limitar sua produção durante o processo de fabricação de cerveja. A comparação entre as vantagens e desvantagens desses processos, entre outros, estão descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Comparação dos custos de instalação, custos operacionais, rendimento e qualidade da cerveja final entre os principais processos utilizados e suas associações para obtenção da cerveja sem álcool. Adaptado de (MULLER *et al.*, 2020).

Processo	Custos de instalação	Custos de operação	Qualidade do produto final
a) Processos biológicos			
Fermentação interrompida	alto	baixo	baixa
Contato com fermento frio	médio	médio	baixa
Utilização de leveduras especiais	médio	médio	baixa
Utilização de leveduras imobilizadas ou biorreatores	alto	médio	baixa
b) Processos térmicos			
Evaporação a vácuo	médio	baixo	baixa
Destilação a vácuo	médio	alto	média
Coluna de cone giratório	médio	médio	médio
b.1) Processo de extração			
Extração com CO ₂	médio	médio	médio
Extração de Adsorção	médio	médio	alta

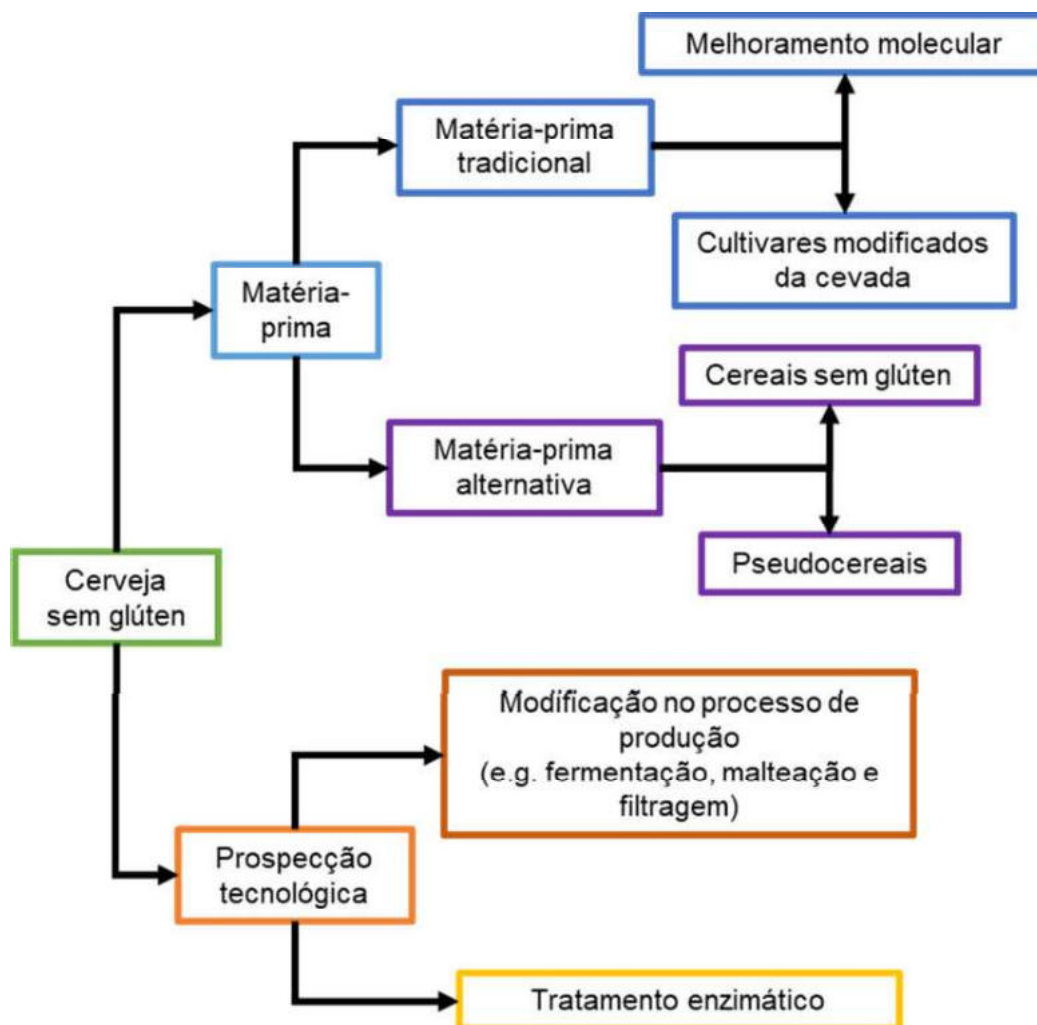
Processo	Custos de instalação	Custos de operação	Qualidade do produto final
b.2) Processos por membrana			
Nanofiltração	médio	médio	alta
Osmose reversa	médio	alto	média
Destilação osmótica	médio	baixo	média
Diálise	baixo	alto	baixa
Pervaporação	baixo	Médio	alta

A escolha de um método para obter uma cerveja com teor alcoólico baixo deve se basear no melhor custo-benefício de produção sempre ponderando com a qualidade do produto final.

Um bom exemplo de custo-benefício é o processo de pervaporação por apresentar um custo de instalação baixo em relação a outros métodos, como por exemplo a diálise, e por obter um produto final de alta qualidade com baixo teor alcoólico (0,3% v/v) (**Tabela 5**). Uma vantagem desse método é a recuperação de compostos voláteis e semivoláteis que compõem as características sensoriais da cerveja (AMBROSI; CARDOZO; TESSARO, 2014; IGNAT *et al.*, 2020).

2.6 PROCESSO DE REMOÇÃO DO GLÚTEN EM CERVEJAS

Diferentemente do que ocorre na remoção do álcool, os métodos para obtenção de cervejas sem glúten derivam de dois tipos de processos (**Esquema 2**) que envolvem a utilização de matérias-primas específicas ou a introdução de métodos de degradação do glúten junto às etapas do processo cervejeiro clássico (e.g. malteação), que chamam de prospecção tecnológica (KERPES; FISCHER; BECKER, 2017).

Esquema 2 - Esquema dos processos empregados na produção de cerveja sem glúten

2.6.1 Matérias-primas alternativas: cereais livres de glúten e pseudocereais

Os cereais livres de glúten mais utilizados são arroz, milho, sorgo, painço, e seus derivados. Outra alternativa são os pseudocereais, que são aqueles que não pertencem à família das Gramíneas, mas que também produzem sementes ricas em amido, tais como trigo-mourisco, amaranto e quinoa. A principal vantagem desses materiais é que eles são, por definição, completamente ausentes de glúten.

Uma desvantagem é que a instalação onde ocorre a etapa de malteação precisa ser adaptada, devido à variação do tamanho do grão. Por exemplo, em comparação com a cevada, o milho tem grãos maiores e mais pesados, enquanto o amaranto é muito menor. Adicionalmente, os parâmetros de

maltagem também são diferentes dos da cevada, podendo ser em temperaturas mais altas (milho, arroz e sorgo) ou mais baixas (amaranto e quinoa); tempos de germinação mais prolongados (arroz e milho); e maior regime de maceração (amaranto, quinoa e painço) (KERPES; FISCHER; BECKER, 2017).

O perfil químico de voláteis para cervejas produzidas a partir de cereais e pseudocereais pode variar de acordo com o tipo de grão utilizado. As cervejas que utilizam o arroz como matéria-prima para produção do malte, apresentam diferenças significativas para a classe dos aldeídos quando comparado com as cervejas de malte de cevada. Por exemplo, no caso do etanol a diferença pode chegar a aproximadamente 30 mg L^{-1} a mais que na cerveja de malte de cevada e para o 2-metilbutanal essa diferença é de aproximadamente de $5 \times 10^{-2} \text{ mg L}^{-1}$ (MAYER *et al.*, 2016).

2.6.2 Prospecção tecnológica na remoção do glúten da cerveja

O processo de remoção do glúten durante a fabricação da cerveja é comumente realizado através de processos enzimáticos com ou sem uma etapa de precipitação proteica (FANARI *et al.*, 2018). Nos processos enzimáticos a redução do glúten pode alcançar uma eficácia de 100%, quando associado a um processo de precipitação com sílica gel, tornando o produto final completamente livre de glúten (FANARI *et al.*, 2018). A prolendopeptidase (PEP) é comumente utilizada nesse tipo de processo. Essa enzima hidrolisa ligações de peptídeos em resíduos de prolina. Posteriormente para remoção completa do glúten emprega-se a sílica gel, pois essa possui uma área superficial muito grande, recoberta por grupos silanol (Si-OH) que tem alta afinidade por resíduos de prolina. Isso causa a formação de grandes flocos que podem ser facilmente removidos por filtração ou tratamentos de precipitação. Vale ressaltar que esses processos, quando utilizados de maneira independente, possuem diferentes eficácias na remoção do glúten, em que a utilização do processo enzimático se mostra mais eficaz frente ao processo empregando apenas precipitação por sílica gel (FANARI *et al.*, 2018; CELA *et al.*, 2020;). A utilização destes métodos pode influenciar no perfil químico de voláteis e semivoláteis da cerveja. Por exemplo, ao utilizar separadamente os métodos de precipitação e enzimático ocorrem diferenças significativas no perfil dos ésteres etílicos. No caso dos

ésteres acetato de etila, nonanoato de etila, dodecanoato de etila e decanoato de etila, a concentração no produto final é maior quando o método enzimático é aplicado (FANARI *et al.*, 2018).

2.7 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA

A análise de compostos orgânicos em cerveja pode ser realizada através de uma gama de técnicas analíticas, tais como: espectroscopia de absorção UV-VIS (BELLIDO-MILLA; MORENO-PEREZ; HERNÁNDEZ-ARTIGA, 2000; VERA *et al.*, 2011; BIANCOLILLO *et al.*, 2014; TAN; LI; JIANG, 2015), cromatografia líquida (LEITAO *et al.*, 2011; QUIFER-RADA *et al.*, 2015), espectroscopia por infravermelho (VERA *et al.*, 2011; BIANCOLILLO *et al.*, 2014; GONZALEZ VIEJO *et al.*, 2018). Outra técnica utilizada para análise de compostos orgânicos em alimentos, incluindo a cerveja, é a ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN). KUBALLA *et al.*, (2018) utilizaram a ^1H RMN para identificar e distinguir os principais tipos e determinar a origem geográfica de cervejas, mel e pimentas com o objetivo de avaliar sua autenticidade e assim identificar possíveis adulterações.

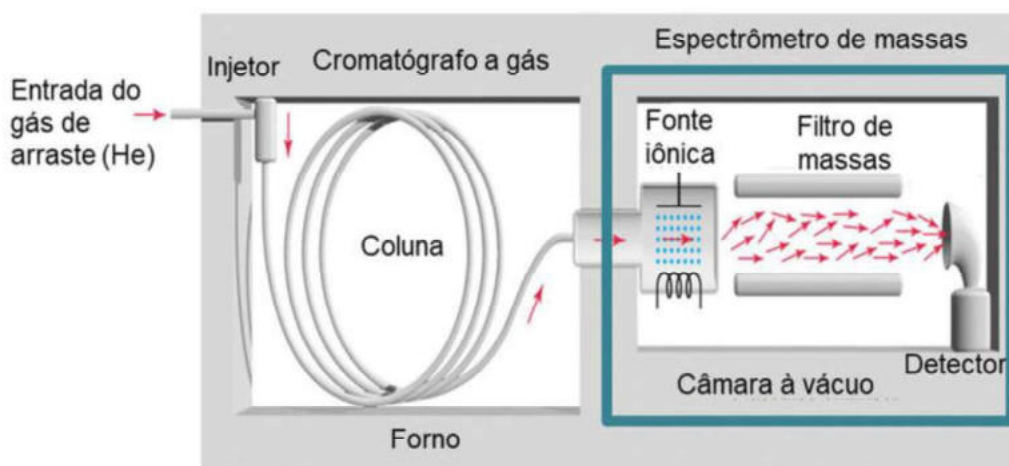
A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas do tipo quadrupolar unidimensional com ionização por impacto de elétrons (CG-EM) é aplicada no estudo de compostos orgânicos voláteis e semivoláteis em cerveja. SEO *et al.*, (2020) utilizaram a CG-EM para diferenciar cervejas dos tipos *ale* e *lager* de 145 marcas de cervejas adquiridas ao redor do mundo. Nesse estudo foram identificados 26 metabolitos, como por exemplo, o butan-2,3-diol e o ácido propanoico. Em outro estudo, ATTACHELOUWA *et al.*, (2020) caracterizaram compostos voláteis associados a mudanças nas características sensoriais, tais como os aldeídos, durante o armazenamento em cervejas de sorgo. ALVES *et al.*, (2020) analisaram o perfil químico de compostos voláteis para as diferentes etapas do processo cervejeiro, identificando 60 compostos correspondentes às classes dos álcoois, aldeídos, ácidos, ésteres e compostos furanos, concluindo que a etapa de fermentação é a que mais influencia no produto final. O estudo realizado por RIU-AUMATELL *et al.*, (2014), comparou oito cervejas alcoólicas padrão e suas correspondentes com baixo teor alcoólico de marcas comerciais

espanholas no mercado local. Esse estudo obteve o perfil químico dos diferentes tipos de cerveja utilizando ferramentas de tratamento estatístico.

2.7.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A cromatografia gasosa é uma poderosa técnica de separação devido à alta seletividade e eficiência de separação. O processo cromatográfico pode ser dividido em três etapas: **i)** introdução da amostra; **ii)** separação; e **iii)** detecção. A introdução da amostra pode ser feita de duas maneiras: a quente e a frio. Na injeção a quente a amostra é introduzida em uma câmara de vaporização (injetor) onde os constituintes da amostra são vaporizados e transferidos para a coluna cromatográfica, onde as condições de temperatura, pressão e volume de injeção vão depender das características da amostra, tais como temperatura de ebulição e concentração. Na separação a frio (*on-column*) a amostra é idealmente introduzida em uma lacuna de retenção conectada à coluna cromatográfica (**Figura 13**).

Figura 13 - Representação de um sistema de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.



Adaptado de (EMWAS *et al.*, 2015)

O processo de separação ocorre pela interação dos constituintes da amostra com a fase estacionária através das interações de *Van der Waals*, sendo que o fator físico-químico envolvido nesse processo é a pressão de vapor

dos analitos. Os gases utilizados na cromatografia gasosa como gás de arraste são hélio (He) e hidrogênio (H₂). Esses gases têm por características um alto grau de pureza que pode variar entre 99,995 e 99,9999% e serem inertes nas condições de temperatura e pressão empregadas no instrumento. Existem vários tipos de colunas cromatográficas que podem variar de acordo com suas dimensões (comprimento (m), diâmetro interno (mm) e espessura de filme da fase estacionária (μm)) e composição da fase estacionária.

As fases estacionárias das colunas cromatográficas variam de acordo com a polaridade e tipos de sítios ativos, como por exemplo: polidimetilsiloxano, fenil-polidimetilsiloxano (apolares); polietileno glicol (polar); cianopropil-polidimetilsiloxano (quiral). Geralmente na análise de compostos polares voláteis a coluna mais utilizada é a composta por polietileno glicol e são conhecidas comercialmente como “wax”. Sua aplicação na química de alimentos está voltada para análises de ácidos livres, álcoois, ésteres, óleos essenciais e glicóis (SHARP, 2001).

O método de detecção mais comumente utilizado na cromatografia gasosa é a detecção por ionização em chama. Entretanto, para obter a identificação molecular inequívoca é necessário a utilização de um espectrômetro de massas. A combinação do cromatógrafo a gás e o espectrômetro de massas é relativamente simples, pois as vazões dos gases e o funcionamento do cromatógrafo são compatíveis com o alto vácuo do espectrômetro de massas.

O espectrômetro de massas é dividido em três partes: fonte de ionização, analisador ou filtro de massas e o detector. Um dos tipos de ionização mais utilizados em CG-EM é a ionização por impacto de elétrons (IE). Na IE os analitos chegam na fonte iônica, já na fase gasosa, e são impactados com elétrons de alta energia (70 eV). Esse processo é capaz de remover um elétron da molécula (M^{+•}), entretanto a energia absorvida nesse impacto pode desencadear uma série de processos, dentre os quais a desestabilização da molécula e consequente fragmentação.

Um dos analisadores de massas mais comumente utilizado em CG-EM é do tipo quadrupolar. O quadrupolo é formado por 4 hastes; os pares opostos das hastes estão conectados eletricamente e uma voltagem com radiofrequência de 180° fora de fase é aplicada entre eles. Dependendo da voltagem aplicada, íons

de uma determinada razão massa carga (m/z) atravessam o quadrupolo descrevendo uma trajetória helicoidal estável chegando no detector. Os resultados obtidos por esse sistema são chamados de cromatograma de massas que é formado por todos os íons que passam pelo analisador de massas e esses íons podem ser referentes a uma faixa de m/z ou m/z específicas gerando um cromatograma de íons totais ("*total ion chromatogram*" - TIC) e um cromatograma de íons selecionados respectivamente.

2.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

A implementação de procedimentos analíticos requer a otimização de um conjunto de condições experimentais que influenciam no seu desempenho final. Podemos citar como exemplo, os parâmetros de extração de amostra (e.g., temperatura, tempo, proporção amostra:solvente, aditivos) ou as condições instrumentais de um método cromatográfico (e.g., coluna cromatográfica, temperatura do injetor, rampa de temperatura do forno, volume de injeção). Portanto, a aplicação de delineamento experimental (DoE) é atualmente uma etapa fundamental no desenvolvimento de procedimentos analíticos (NOVAES *et al.*, 2017). Na literatura é possível encontrar exemplos do uso do DoE na análise de cervejas, como é o caso de RODRIGUEZ-BENCOMO *et al.*, (2012) que utilizou a técnica de DoE com composto central para otimização de método de Micro Extração por Fase Sólida (MEFS) avaliando três fatores, temperatura de extração, tempo de extração e volume de amostra para cervejas armazenadas sob condições variadas de temperatura, por um período de cinco meses.

Essa técnica de composto central permite a criação de superfície de resposta capazes de identificar as melhores condições de análise do método a ser otimizado. No delineamento de composto central, cada variável testada é avaliada em 5 níveis diferentes o que aumenta sua precisão com um número relativamente baixo de experimentos, quando comparado ao método de planejamento de fatorial completo, com consiste na técnica mais básica de DoE.

Sempre que se realiza uma otimização o procedimento é realizado em função de uma variável resposta que pode ser por exemplo, a concentração de um determinado analito ou a área de um pico cromatográfico.

Porém, em alguns casos pode ser desejável fazer uma otimização em função de mais de uma variável resposta. Nesses casos se utiliza a função de desejabilidade. Esta metodologia baseia-se na transformação de cada resposta individual em uma escala adimensional de desejabilidades individuais (d_i). A escala de desejabilidades individuais pode variar de 0 (para uma resposta inaceitável) a 1 (para a resposta desejada). Esta transformação torna possível combinar os resultados obtidos para as propriedades medidas em diferentes ordens de grandeza. Com as desejabilidades individuais, torna-se possível obter a desejabilidade global (D), definida como a média geométrica das desejabilidades individuais (d_i) de acordo com a equação (**Equação 1** e **Equação 2**).

$$\frac{y - L}{U - L}^r, L \leq y \leq U$$

Equação 1. Desejabilidade individual por *largest the best*

$$D = ((d_1)^{w_1} (d_2)^{w_2} \dots (d_p)^{w_p})^{\frac{1}{\sum_{i=1}^p w_i}}$$

Equação 2. Desejabilidade global

Onde,

y = resposta medida;

L = limite inferior das respostas;

U = limite superior das respostas;

r = peso da resposta;

w_i = peso da variável.

2.9 ANÁLISE MULTIVARIADA

As análises multivariadas são ferramentas utilizadas para reconhecer padrões de similaridade dentro de um conjunto de dados com diversas variáveis, como é o caso de reconhecimento de marcadores químicos dentro de perfis químicos globais. Os métodos mais utilizados são, análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) e a Análise de Componentes Principais (PCA) (ANTONIO e AGUIAR, 2020).

O HCA e o PCA são métodos não supervisionados, ou seja, métodos que não dependem de um conhecimento prévio sobre as características das amostras. Estas técnicas são complementares na determinação da similaridade das amostras. No HCA essa similaridade é geralmente expressa na forma da distância Euclidiana que as amostras apresentam quando posicionadas em um universo multidimensional onde cada dimensão corresponde a uma variável analisada, por exemplo a concentração de um determinado analito (ANTONIO e AGUIAR, 2020).

No PCA as variáveis estudadas são compiladas em novas variáveis conhecidas como Componentes Principais. Cada componente principal criada representa parte da variância dos dados originais. O uso das componentes principais visa diminuir as dimensões do universo de variáveis da análise, o que por fim possibilita indicar quais das variáveis originais tem maior influência no padrão de similaridade das amostras (ANTONIO e AGUIAR, 2020).

3 JUSTIFICATIVA

A cerveja é uma bebida alcoólica milenar que foi se tornando cada vez mais complexa com passar do tempo, surgindo diferentes famílias e escolas, gerando bebidas dos mais variados tipos e sabores. Essa complexidade está relacionada à matéria-prima e aos processos empregados na obtenção desses produtos. Além disso, nas últimas décadas surgiu a demanda por cervejas sem álcool e sem glúten impulsionados por questões sociais e de saúde pública.

Esses produtos podem ser obtidos utilizando diversas matérias-primas e processos, porém dependendo do que for utilizado pode ocorrer um impacto significativo no perfil sensorial da cerveja. Da mesma forma que seus equivalentes, os produtos não alcoólicos e sem glúten precisam atender a critérios de qualidade e esse acompanhamento do processo geralmente é realizado através de análises sensoriais, as quais estão sujeitas a subjetividades do provador. Por conta disso, a presença de compostos que podem surgir no produto final ou durante o “tempo de prateleira”, através de reações químicas e fotoquímicas, podem passar despercebidos.

A indústria de alimentos tem se preocupado cada vez mais em caracterizar quimicamente seus produtos, não somente para fins de controle de qualidade, mas também na busca por inovação e a indústria cervejeira vem acompanhando essa tendência. Para que esse avanço ocorresse, o surgimento e utilização de técnicas analíticas instrumentais foi fundamental para possibilitar a realização de estudos sobre a composição e caracterização química molecular da cerveja de forma mais objetiva. Isso tornou possível associar os sabores e aromas ao seu perfil químico molecular. Nesse contexto a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas tem se destacado como uma importante ferramenta analítica na caracterização de produtos cervejeiros.

Deste modo foi desenvolvido um método analítico robusto e prático utilizando a técnica de CG-EM para obtenção do perfil químico molecular de produtos cervejeiros, o qual foi capaz de identificar 31 compostos de diferentes classes químicas, tais como álcoois, ácidos, aldeídos, compostos fenólicos e compostos oriundos das reações de Maillard. Este método é de fácil implementação para indústria cervejeira, pois utiliza uma forma de extração

rápida e econômica, possibilitando a utilização em controle de qualidade (análises em batelada) e em pesquisa e desenvolvimento de novos produtos.

4 OBJETIVOS

Avaliação do perfil químico molecular de compostos voláteis e semivoláteis em diferentes produtos cervejeiros (com álcool, sem glúten e sem álcool), utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), aliada ao planejamento experimental (DoE) e a métodos estatísticos multivariados (HCA e PCA) para monitoramento das alterações nas propriedades químico sensoriais em procedimentos de remoção do glúten e do álcool, com potenciais aplicações na indústria de bebidas fermentadas.

Como etapas para o cumprimento deste estudo, são apresentados os seguintes objetivos específicos:

- Desenvolver um método de análise, utilizando CG-EM, para estudo de compostos voláteis e semivoláteis em produtos cervejeiros;
- Otimizar os parâmetros instrumentais para obtenção do perfil químico de produtos cervejeiros por CG-EM utilizando DoE;
- Otimizar o método de preparo de amostra utilizando DoE;
- Determinar os perfis químicos para os diferentes tipos de cervejas avaliadas;
- Comparar o perfil químico de voláteis e semivoláteis de produtos cervejeiros com e sem álcool;
- Comparar o perfil químico de voláteis e semivoláteis de produtos cervejeiros com e sem glúten;
- Identificar os principais marcadores químicos através das análises de HCA e PCA que influenciaram na diferenciação entre os produtos cervejeiros.

5 EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAL E AMOSTRAS

O solvente e o sal utilizados nos procedimentos de extração das amostras e no preparo das soluções padrão foram respectivamente o metil terc-butil éter (MTBE) (99,9% Absolv, Sigma-Aldrich, Israel) e o sulfato de sódio anidro obtido da Tedia® (Brasil).

Toda a vidraria utilizada foi limpa através da lavagem com água; lavagem com detergente comercial neutro; lavagem com água em abundância; imersão em solução de Extran alcalino 2% (Merck, Rio de Janeiro, Brasil) por no mínimo 24 horas; lavagem com água; rinsagem com água destilada; secagem em estufa a aproximadamente a 105°C (exceção para material volumétrico que foi seco a temperatura ambiente).

5.2 PADRÕES ANALÍTICOS

Os padrões utilizados na otimização do método cromatográfico foram furan-2-carbaldeído (furfural) (99%), 5-(hidroximetil) furan-2-carbaldeído (HMF) (99%), nonanal (99,9%), butanal (98,5%), 3-metilbutanal (99,4%), trans-2-nonanal (96,9%), butano-2,3-diol (99,8%), pentan-1-ol (99,9%), octan-1-ol (99,7%) e 2-metilpentanal (99,3%) todos adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil); nonanal (99,9%) obtido da Janssen Chimica (Beerse, Bélgica). O padrão interno deuterado (PI) utilizado nas análises das amostras foi o álcool *n*-decílico-D₂₁ (99%) adquirido da CDN Isotopes (Quebec, Canadá).

Para a realização dos experimentos de otimização da análise cromatográfica foi utilizado uma mistura de padrões na concentração de 1 mg mL⁻¹. O preparo dessa mistura foi realizado empregando um balão volumétrico de 10 mL e pipetas automáticas de 100 µL e 10 µL. Esta solução foi denominada de solução estoque. As substâncias padrão utilizadas no preparo da solução estoque foram: furan-2-carbaldeído, 5-(hidroximetil)-furan-2-carbaldeído (HMF), nonanal, butanal, 3-metilbutanal, trans-2-nonanal, butano-2,3-diol, pentan-1-ol, octan-1-ol e 2-metilpentanal. O solvente metil terc-butil éter foi utilizado como diluente no preparo desta solução.

A partir da solução estoque foi realizada uma diluição para a concentração de $10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$. A solução diluída foi empregada nos experimentos de otimização de métodos (DoE).

Devido à sensibilidade do padrão de (HMF) à atmosfera, foi utilizada toda massa que estava contida no frasco (25 mg) no preparo da solução, visto que, no ato da pesagem já ocorre a degradação da substância. Então, uma solução de 10 mg mL^{-1} foi preparada em balão volumétrico de 25 mL seguida de diluição para preparo de solução 1 mg mL^{-1} .

5.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO

O método de extração selecionado foi a extração líquido-líquido assistida por dessalgamento (*salting out*). Para realizar a extração foram otimizados os parâmetros: proporção solvente:amostra, tempo de extração e quantidade de sal. Para a realização destes experimentos foi preparada uma mistura com diferentes marcas de cerveja alcoólica e com glúten do tipo *pilsen* adquiridas comercialmente a fim de torná-la representativa do universo amostral. Esta mistura foi preparada a partir da junção de alíquotas de igual volume (5mL) das amostras selecionadas para o estudo.

Para realizar a ELL foi tomada uma alíquota de 5 mL da mistura, e a esta foi adicionado 1 mL de padrão interno ($5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) e quantidade de sal necessária para cada experimento (**Tabela 6**). Em seguida, a amostra foi extraída em agitador orbital pelo tempo requerido em cada experimento. Após esta etapa ocorreu a separação das fases orgânica e aquosa por centrifugação a 4000 rpm por 10 minutos. Por fim, a fase orgânica foi transferida para os frascos de injeção de 2 mL e encaminhados para análise por CG-EM. A otimização do método foi realizada via planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central (**Tabela 6**).

Tabela 6. Matriz de planejamento para otimização do método de extração

Fator	Nível -1	Nível 0	Nível + 1
Proporção amostra:solvente (mL:mL)	5:1	5:2	5:3
Tempo de extração (min)	5	10	15
Aditivo para <i>salting out</i> (g)	1	2	1,5

As variáveis resposta utilizadas foram a quantidade de substâncias identificadas e suas respectivas áreas dos picos cromatográficos. Neste caso também foi realizada a otimização multivariada empregando a função de desejabilidade pelo *Largest the best* (**Equações 1 e 2** do item 2.8).

5.4 INSTRUMENTAÇÃO ANALÍTICA

As análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram executadas em um instrumento Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA) com um cromatógrafo a gás modelo 6890N equipado com um amostrador automático 7673, acoplado a um espectrômetro de massas modelo 5973, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida Carbowax (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), 100% Polietilenoglicol (30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm df).

Os dados obtidos nos cromatogramas de íons totais (TIC, *total ion chromatogram*) e nos cromatogramas de íons extraídos (EIC, *extracted ion chromatogram*) foram tratados com auxílio do programa MSD *ChemStation* E.02.02.1431 em que foram calculadas as áreas dos picos cromatográficos.

Os cálculos para obtenção das concentrações relativas dos analitos foram realizados a partir da **Equação 3**. Estes cálculos foram efetuados utilizando o programa Microsoft Excel versão 2016, assim como as demais análises de estatística descritiva.

$$C = \frac{\left(\frac{A \times C_{PI}}{A_{PI}} \right)}{FD}$$

Equação 3. Cálculo da concentração relativa dos analitos

Em que:

C = concentração do analito (ng µL⁻¹);

C_{PI} = concentração do padrão interno (ng µL⁻¹);

A_{PI} = área do padrão interno;

FD = fator de diluição.

A identificação das substâncias foi feita por comparação do espectro de massas obtido com o da biblioteca NIST *Mass Spectral* versão 2.0. Como critério de identificação foi utilizado um filtro de similaridade, onde apenas as substâncias com espectros de massas apresentando similaridade maior que 700 (>70%) foram avaliadas. As amostras foram analisadas a partir do TIC e do EIC.

5.4.1 Otimização da análise cromatográfica

A otimização das condições cromatográficas foi realizada a partir de DoE, utilizando método de composto central (**Tabela 7**). Os fatores utilizados foram temperatura inicial do forno, temperatura do injetor, vazão do gás de arraste e taxa de aquecimento. A escolha dos níveis utilizados foi baseada em um método já existente no Laboratório de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico (LADETEC) que foi desenvolvido durante a execução de projetos de colaboração técnico-científico do Núcleo de Análises Forenses (Projeto 21687 - etapa 1 / Projeto 22172 - etapa 2) com a empresa Ambev (**Tabela 7**) (RIU-AUMATELL *et al.*, 2014).

Tabela 7 - Matriz de planejamento para otimização de método de análise instrumental por CG-EM.

Fatores	Níveis				
	- α	-1	0	+1	+ α
Temperatura inicial do forno (°C)	35	40	45	50	55
Temperatura do injetor (°C)	170	180	190	200	210
Vazão (mL min ⁻¹)	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3
Taxa de aquecimento (°C min ⁻¹)	3	4	5	6	7

A variável resposta utilizada durante a otimização foi a área dos picos cromatográficos dos analitos presentes na mistura de padrões contendo furan-2-carbaldeído, 5-(hidroximetil)-furan-2-carbaldeído (HMF), nonanal, butanal, 3-metilbutanal, trans-2-nonanal, butano-2,3-diol, pentan-1-ol, octan-1-ol, 2-metilpentanal e o nonanal. Para realizar esta otimização multivariada a resposta das áreas de cada analito foi combinada em um único valor de resposta através da função de desejabilidade, procurando o maior resultado possível (*Largest the*

best) (**Equações 1 e 2**). Os demais parâmetros instrumentais empregados na análise e que foram mantidos constantes estão evidenciados na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Parâmetros instrumentais da análise por CG-EM.

Parâmetros cromatográficos	
Volume de injeção	1 µL
Modo de injeção	Sem divisão de fluxo
Temperatura da interface	230 °C
Temperatura da fonte	150 °C
Temperatura do quadrupolo	230 °C
Modo de aquisição	Varredura de íons <i>m/z</i>
Faixa de varredura de massa	<i>m/z</i> 40 até 300

5.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

A análise das amostras comerciais foi realizada empregando as condições otimizadas tanto para a análise cromatográfica quanto para o método de extração.

Foram selecionadas dez amostras das cinco marcas diferentes, sendo três dessas marcas de cervejas sem álcool e seu produto original alcoólico e duas sem glúten e seu produto original com glúten (**Tabela 9**). As amostras foram adquiridas no comércio local, na cidade do Rio de Janeiro. Todas as cervejas eram do tipo *pilsen* da família *lager*. O critério utilizado na seleção das amostras foi que os pares alcoólicos e sem glúten pertencessem a mesma marca.

Tabela 9 - Descrição das amostras comerciais utilizadas no estudo.

Amostra	Tipo de amostra		
	Com álcool e com glúten	Sem álcool e com glúten	Com álcool e sem glúten
Marca 1	X	X	
Marca 2	X	X	
Marca 3	X	X	
Marca 4	X		X
Marca 5	X		X

5.5.1 Tratamento de dados

Para realizar o planejamento experimental, obter os gráficos de Pareto, superfícies de resposta e o efeito dos fatores foi utilizado o programa *Chemoface* versão 1.65.

A comparação das amostras comerciais foi realizada por análise estatística multivariada de agrupamentos, através das técnicas de Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) e Análises de Componentes Principais (PCA) utilizando o programa *OringPro* versão 2017. Para o PCA foi utilizado o método de Ward empregando distância Euclidiana.

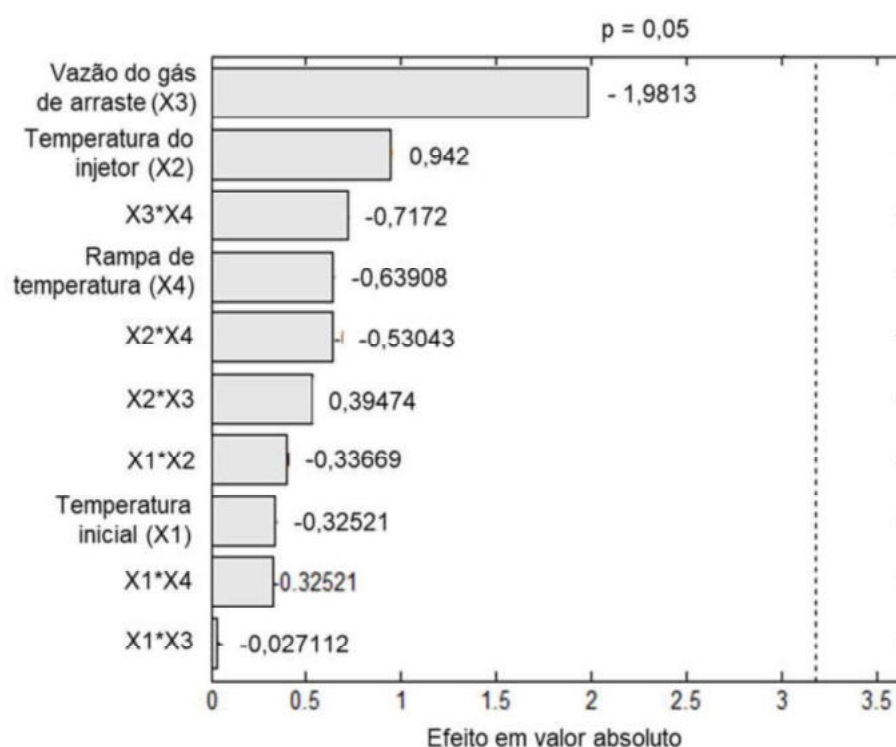
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

A otimização do método cromatográfico foi realizada para garantir a melhor resolução no menor tempo de análise possível visando obter as melhores condições de exatidão, precisão e sensibilidade. A variável resposta escolhida para esta etapa foi a área do pico cromatográfico dos analitos de interesse, pois esse parâmetro está relacionado com a sensibilidade, uma vez que uma maior resposta de área temos redução da relação sinal/ruído.

Dentre os parâmetros avaliados (temperatura inicial do forno (**X1**), temperatura do injetor (**X2**), vazão do gás de arraste (**X3**) e rampa de temperatura do forno (**X4**)), nenhum apresentou um efeito significativo ao nível de confiança de 95% na variável resposta, tanto de forma independente quanto a combinação entre eles (**Figura 14**). Apesar dos efeitos não terem sido significativos, é possível observar por meio do gráfico de Pareto quais interações entre parâmetros (**X1**, **X2**, **X3**, **X4**) melhoram a resposta analítica.

Figura 14 - Gráfico de Pareto para a otimização das condições cromatográficas.

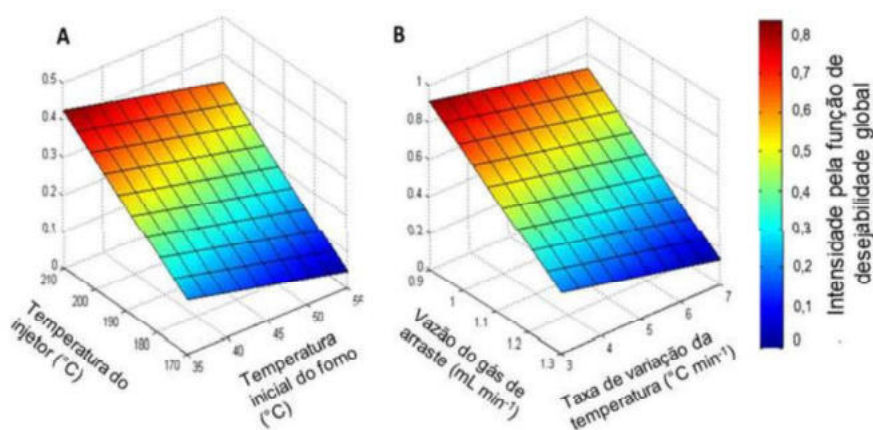


Os valores de efeito, nesse caso, ainda indicam através dos sinais positivo e negativo a tendência de melhorar a performance do método de acordo com o nível empregado. Por exemplo, efeitos com valores positivos significam que para aquele determinado parâmetro o uso dos níveis com sinal positivo (+1 e + α) possibilitam aumentar a resposta analítica.

A partir do gráfico de Pareto pode-se observar quais parâmetros devem ser priorizados, como é o caso da vazão do gás de arraste (**X3**), que foi o que mais influenciou significativamente, seguido da temperatura do injetor (**X2**) e da interação entre gás de arraste (**X3**) e rampa de temperatura do forno (**X4**). Então, esses parâmetros foram utilizados para a construção de uma superfície de resposta a fim de obter os valores numéricos otimizados dos parâmetros selecionados nesse trabalho.

Foram geradas superfícies de resposta a fim de otimizar a resposta influenciada pelos diversos parâmetros. A superfície de resposta é um gráfico de grade tridimensional que é útil para determinar os valores de resposta desejáveis e as condições de funcionamento. De acordo com as superfícies de resposta geradas (**Figura 15**) as condições que forneceram a melhor performance foram: temperatura inicial do forno 35°C, temperatura do injetor 210°C, vazão do gás de arraste 0,9 mL min⁻¹ e taxa de variação da temperatura do forno 3 °C min⁻¹.

Figura 15 - Superfície de resposta da interação entre os parâmetros **(A)** temperatura do injetor e temperatura do forno **(B)** vazão do gás de arraste e taxa de variação da temperatura do forno.



A temperatura inicial do forno em 35°C (**Figura 15A**) favoreceu o aumento da intensidade devido ao efeito de focalização. Este efeito se dá pela diferença de temperatura do injetor e a temperatura inicial do forno cromatográfico. Este efeito pode ser observado na **Figura 15A** ao tomar como constante a temperatura do injetor em 210 °C. É possível observar que a resposta tende a melhorar conforme a diferença de temperatura aumenta entre o injetor e o forno, tornando o efeito de focalização mais pronunciado.

No desenvolvimento de métodos cromatográficos se preconiza que a temperatura do injetor deve estar a pelo menos 10 °C acima do ponto de ebulição do composto menos volátil, para garantir que todos os componentes da amostra se volatilizem instantaneamente. Dentre a mistura de padrões utilizada nesta etapa, o composto menos volátil é o octan-1-ol com ponto de ebulição igual a 195 °C. Tal fato pode ser observada nos resultados obtidos (**Figura 15A**) onde a temperatura de 210 °C foi a que mostrou os melhores resultados, pois, nesse caso está de acordo com a teoria.

A taxa de variação da temperatura do forno é o fator que mais influência na separação dos componentes da amostra. Ao passo que se esta taxa aumenta, o tempo de retenção dos compostos diminuem ao mesmo tempo que a interação com a fase estacionária decresce, o que pode ocasionar coeluição dos picos cromatográficos. Este fenômeno faz com que a identificação e a quantificação dos compostos sejam comprometidas, visto que não é possível identificar o início e o final dos picos cromatográficos. Deste modo, os resultados obtidos estão de acordo com o esperado, em que a menor taxa de variação do forno foi a mais adequada, conforme pode ser observado na **Figura 15B** em que o ponto com intensidade para função de desejabilidade (ponto ótimo) encontra-se na região de menor valor de taxa de variação do forno (**X4**) igual a 3°C min⁻¹.

Apesar da vazão do gás de arraste (**X3**) ter sido o fator com o maior efeito na variável resposta observada no gráfico de Pareto, em teoria, este seria o que menos influenciaria a área dos picos. Este parâmetro, na verdade teria maior impacto na resolução cromatográfica, pois esse parâmetro está relacionado à altura dos pratos teóricos da coluna cromatográfica. Para os valores de vazão, os resultados indicaram uma tendência de melhora da variável resposta em vazões menores, no caso 0,9 mL min⁻¹ (**Figura 15B**). Este parâmetro, aliado à taxa de variação do forno tem impacto direto na resolução cromatográfica de

modo que quanto maior a vazão menor pode ser a resolução devido à menor interação dos compostos com a fase estacionária. Nas condições cromatográficas otimizadas (**Tabela 10**) foi obtido o perfil cromatográfico apresentado na **Figura 16**.

Figura 16 - Cromatograma da mistura de padrões nas condições otimizadas do método cromatográfico. **Legenda dos picos:** **1)** 2-metil-1-pentanal; **2)** pentan-1-ol; **3)** nonanal; **4)** furan-2-carbaldeído; **5)** trans-2-nonanal; **6)** butan-2,3-odiol (isômero); **7)** octan-1-ol; **8)** 5-(hidroximetil) furan-2-carbaldeído.

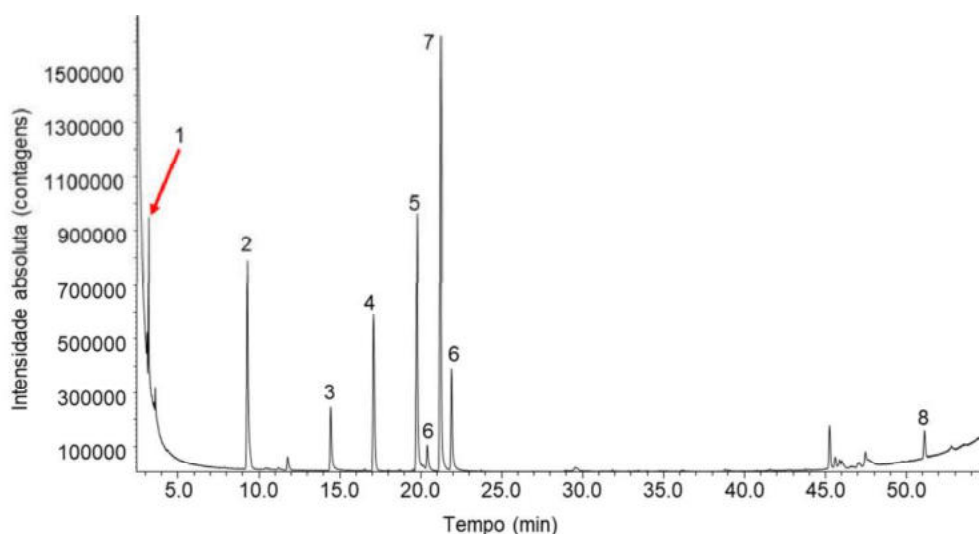


Tabela 10 - Parâmetros cromatográficos completos, incluindo os valores obtidos após a otimização por DoE.

Parâmetros cromatográficos	
Volume de injeção	1 μL
Modo de injeção	Sem divisão de fluxo
Temperatura inicial do forno (X1)	35 $^{\circ}\text{C}$
Temperatura do Injetor (X2)	210 $^{\circ}\text{C}$
Vazão do gás de arraste (X3)	0,9 mL min^{-1}
Taxa de aquecimento do forno (X4)	3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$
Temperatura final do forno	200 $^{\circ}\text{C}$

Os efeitos apresentados no gráfico de Pareto calculados através do delineamento experimental (DoE) demonstraram que as variações nos fatores

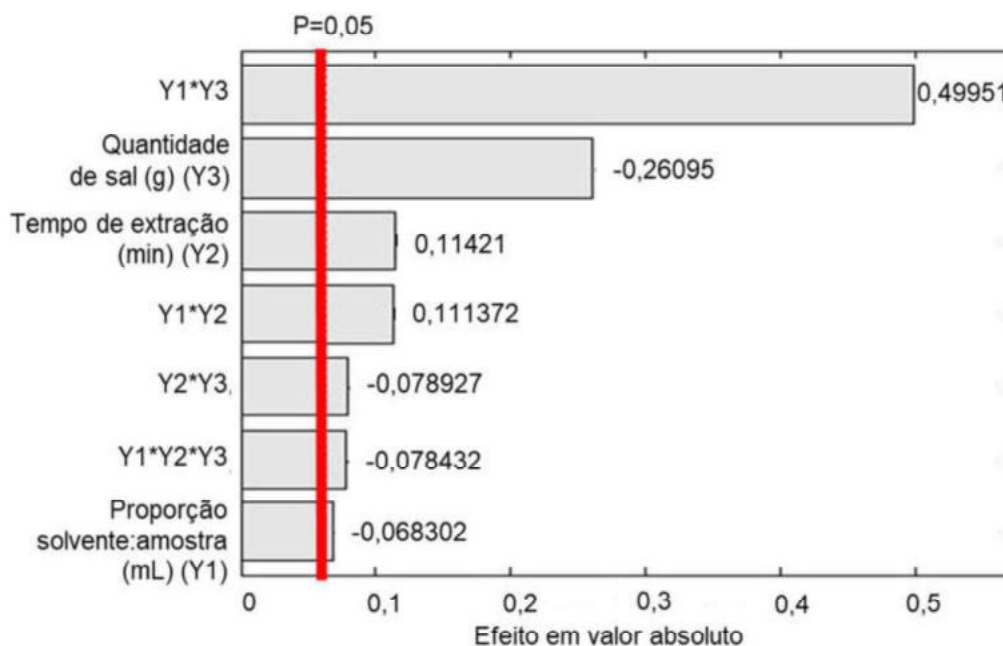
(**Tabela 7**, seção 5.4.1) não influenciaram significativamente na variável resposta. Logo, pode-se indicar que o método otimizado apresenta robustez. Isso implica que, pequenas variações não controladas, provenientes de erros aleatórios instrumentais, tais como variações das condições de temperatura da sala de instrumentos bem como os próprios parâmetros avaliados, não afetariam significativamente a precisão dos dados obtidos.

6.2 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL)

Na extração líquido-líquido a cerveja correspondeu à fase aquosa e o metil-terc-butil-éter (MTBE) à fase orgânica. Para melhorar a difusão dos analitos em uma das fases, podem ser utilizados aditivos, como por exemplo, sais inorgânicos. Para compostos que são poucos solúveis em solventes orgânicos o uso de aditivo pode favorecer a difusão da fase aquosa (amostra) melhorando a sensibilidade e precisão do método.

De acordo com o gráfico de Pareto referente à otimização da ELL (**Figura 17**) todos os fatores (solvente:amostra (**Y1**), tempo de extração (**Y2**) e quantidade de sal Na_2SO_4 (**Y3**)) tiveram efeitos significativos na resposta do método. A análise dos dados demonstrou que a interação entre os fatores proporção solvente:amostra (**Y1**) e quantidade de aditivo (Na_2SO_4) (**Y3**) apresentou o efeito mais significativo na variável resposta (**Figura 17**). Observando o gráfico de Pareto, o efeito de primeira ordem referente à quantidade de sal (**Y3**) adicionada foi o de maior significância entre os efeitos de primeira ordem obtidos. Também no gráfico o efeito do fator quantidade de sal é negativo, indicando que o uso do nível -1 (1g de sal) foi o que gerou a melhor resposta analítica.

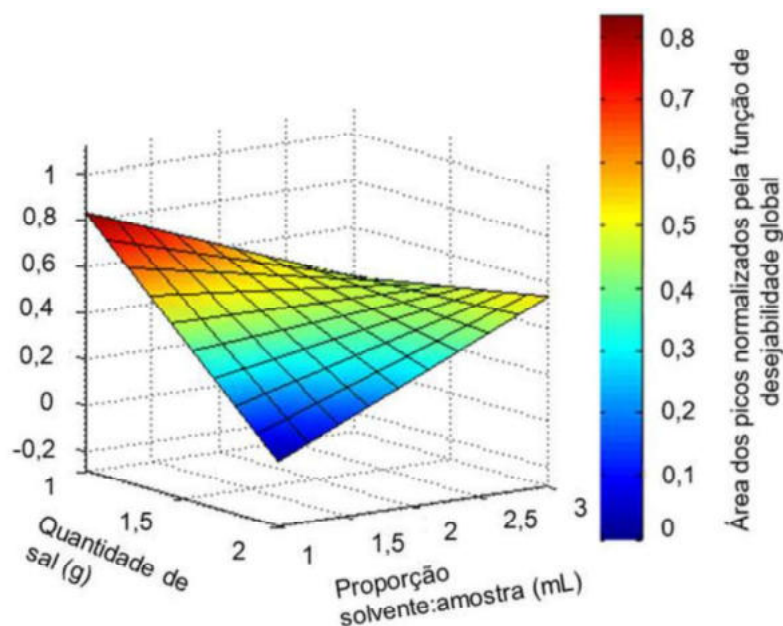
Figura 17 - Gráfico de Pareto para otimização da extração líquido-líquido (ELL).



Para que ocorra o efeito de *salting out* a amostra deve estar com a concentração de sal em um nível de saturação específico. Ao se utilizar grandes quantidades do aditivo pode ocorrer a supersaturação do meio favorecendo a formação de cristais amorfos ao invés da dissolução do sal. A formação desses cristais pode ocasionar a oclusão dos compostos fazendo com que ocorra a perda na eficácia da extração diminuindo a sensibilidade do método.

A interação da quantidade de sal e a proporção solvente:amostra (**Figura 18**) demonstrou que ao se empregar volumes maiores que 1 mL de solvente de extração, independentemente da quantidade sal, não ocorreu melhora na performance da análise. A variação da quantidade de solvente não influenciou a variável resposta evidenciando a eficácia do *salting out*. Em teoria, a performance da ELL sem *salting out* pode ser melhorada empregando maiores quantidades de solvente, uma vez que nessas condições não ocorre a saturação da fase orgânica com os analitos presentes na amostra. Entretanto, neste caso, como se trata de compostos voláteis, o que impossibilita a etapa de concentração do extrato, um volume de solvente em excesso poderia fazer com que os analitos ficassem abaixo do limite de detecção. Esse fenômeno é evidenciado ao se observar a constância na intensidade da variável resposta ao se utilizar o volume de 3 mL (**Figura 18**).

Figura 18 - Gráfico da superfície de resposta da interação entre a quantidade de sal (g) e a proporção solvente:amostra (mL).



O ponto de mínimo observado no gráfico (**Figura 18**) ocorreu nas condições 1 mL de solvente e 2 g de sal, evidenciando a ocorrência da saturação do meio. Nessas condições foram extraídos 27 compostos. Enquanto que, no ponto de máximo foram identificados 29 compostos. Isso demonstra que, possivelmente, ocorreu a oclusão dos compostos devido à formação de cristais amorfs pela supersaturação do meio.

Ao se estudar superfícies de resposta é preferível encontrar pontos de máxima em gráficos com comportamento parabólico, onde é possível observar uma redução da variável resposta ao passar do ponto de máximo. O gráfico de superfície de resposta não apresentou tal comportamento (**Figura 18**), entretanto ele evidenciou que a tendência de quantidades menores de sal melhorou a eficácia da extração. Apesar de não ter sido avaliado quantidades menores que 1 g (nível -1) sabe-se que a redução desses valores tenderia a diminuir o efeito do *salting out* até que não se faria mais presente, completando um comportamento parabólico na superfície de resposta.

O fator tempo de extração foi significativo para o intervalo de confiança de 95% (**Figura 18**), sendo que seu efeito sobre a variável resposta é mais significativo que o fator proporção solvente:amostra. Para esse fator o nível +1

(15 min) foi o que forneceu a melhor resposta para as concentrações dos analitos identificados. Foi observado um aumento de concentração entre os níveis -1 (5 min) e + 1 (15 min) em termos de porcentagem variando de 0,089 até 12,100% para 17 dos 29 compostos identificados.

6.3 ESTUDO DO PERFIL QUÍMICO MOLECULAR DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

Nesta etapa, após a otimização das etapas de preparo das amostras (**Tabela 11**) e análise por CG-EM (**Tabela 10**) utilizando planejamento experimental, foram analisadas 10 amostras de cervejas comerciais, conforme apresentado na **Tabela 9** (seção 5.5).

Tabela 11 - Parâmetros da extração líquido-líquido obtidos após a otimização por DoE.

Parâmetros da extração líquido-líquido		
Y1	Proporção solvente amostra (mL)	1:5
Y2	Tempo de extração (min)	10
Y3	Quantidade de sal (g)	5

A partir da análise das amostras foram identificados no total 31 compostos diferentes, sendo o número do pico 20 referente ao padrão interno (PI) adicionado (**Tabela 12**). Estas substâncias pertencem as seguintes classes químicas: álcool, aldeído, cetona, hidrox cetona, ácidos e compostos fenólicos, compostos sulfurados.

Tabela 12 - Lista de compostos identificados e seus tempos de retenção

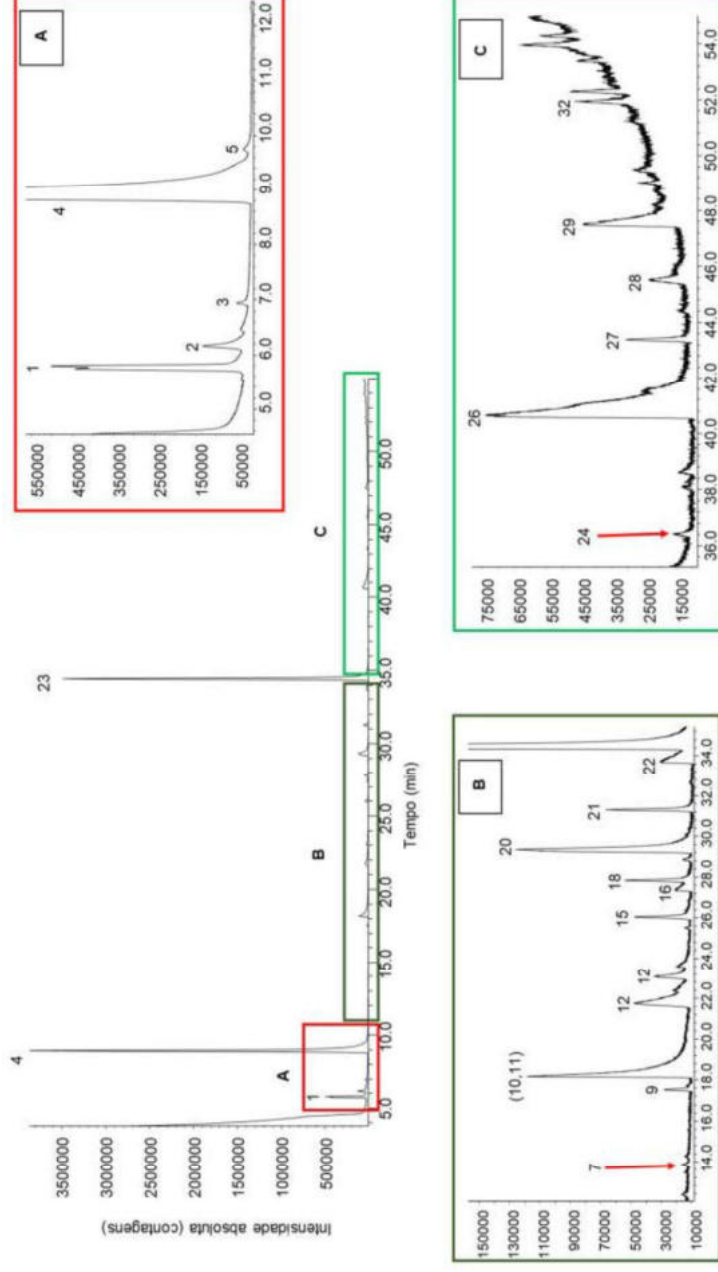
Número do pico	Classe química	Nome do composto	Tempo de Retenção*, t _R (min)
1	Álcool	2-metilpropano-1-ol	5,76
2	Éster	etanoato de isopentila	6,16
3	Álcool	butan-1-ol	6,92
4	Álcool	3-metilbutan-1-ol	8,93
5	Éster	hexanoato de etila	9,76
6	Hidrox cetona	3-hidroxibutan-2-ona	11,32
7	Éster	2-hidroxipropanoato de etila	13,81
8	Hidrox cetona	2-hidroxipentan-3-ona	14,10
9	Éster	octanoato de etila	17,53
10	Aldeído	furano-2-carbaldeído	18,27

Número do pico	Classe química	Nome do composto	Tempo de Retenção*, t _R (min)
11	Ácido	Ácido acético	18,61
12	Álcool	butano-2,3-diol	21,78
13	Ácido	ácido 2-metilpropanoico	22,87
12	Álcool	butano-2,3-diol	23,27
14	Álcool	propano-1,2-diol	23,49
15	Ácido	ácido butanoico	25,50
16	Furano	furan-2-ilmetanol	26,04
17	Ácido	ácido 2-metilbutanoico	27,04
18	Sulfurado	3-metilsulfanilpropan-1-ol	27,82
19	Cetona	4-hidroxibutan-2-ona	28,48
20	Álcool	decan-1-ol D ₂₁ (PI)	29,32
21	Éster	acetato de 2-feniletila	31,29
22	Ácido	ácido hexanoico	33,28
23	Álcool	2-feniletanol	34,44
24	Cetona	1-(1H-pirrol-2-il)-etanona	36,38
25	Cetona	4-hidroxi-2,5-dimetilfuran-3-ona	38,58
26	Ácido	ácido octanoico	40,27
27	Álcool	2-metoxi-4-vinilfenol	43,37
28	Pirona	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona	45,47
29	Ácido	ácido decanoico	47,04
30	Fenólico	4-hidroxifeniletil álcool (Tyrosol)	47,76
31	Ácido	ácido 4-etoxi-4-oxobutanoico	50,19
32	Aldeído	5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído	51,91

*Tempo de retenção aproximado para todas as amostras

Os cromatogramas das análises qualitativas para as 10 amostras são apresentados nas **Figuras 19 a 28**. Os analitos identificados foram numerados na ordem de eluição (**Tabela 12**) e essa numeração se mantém fixa para todos os compostos ao longo das análises. Para uma melhor visualização dos compostos minoritários foram realizadas 3 expansões nos cromatogramas, as quais, foram denominadas regiões expandidas A, B e C.

Figura 19 - TIC e regiões expandidas – **Marca 1** alcoólica.



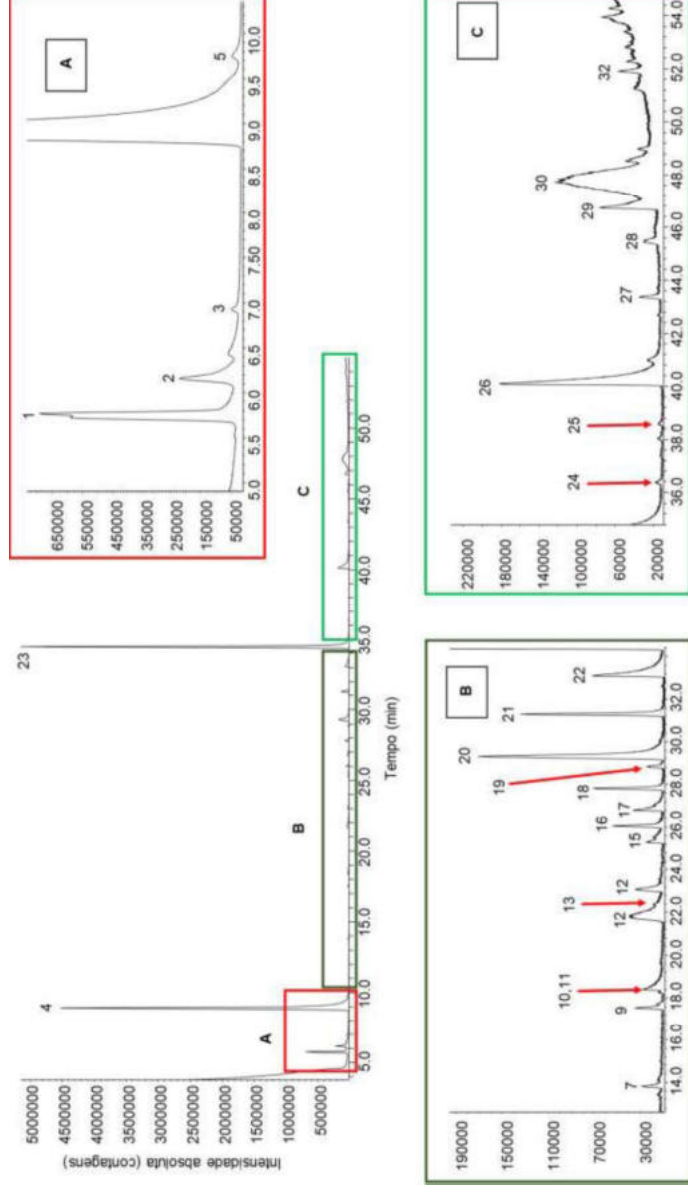
Legenda dos picos: 1) 2-metilpropan-1-ol; 2) etanoato de isopentila; 3) butan-1-ol; 4) 3-metilbutan-1-ol; 5) hexanoato de isopentila; 7) 2-hidroxi-propanoato de etila; 9) octanoato de etila; 10) furan-2-carbaldeído; 11) ácido acético; 12) butano-2,3-diol (isômero); 16) furan-2-ilmetanol; 17) ácido 2-metilbutanoico 18) 3-metilsulfanilpropan-1-ol; 20) decan-1-ol D₂₁ (PI); 21) acetato de 2-feniletila; 22) ácido hexanoico; 23) 2-feniletanol; 24) (1H-pirrol-2-il)-etanona; 26) ácido octanóico; 27) 2-metoxi-4-vinilfenol; 28) 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona; 29) ácido decanoico 32) 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído.

Figura 20 - TIC e regiões expandidas – **Marca 1** não alcoólica.



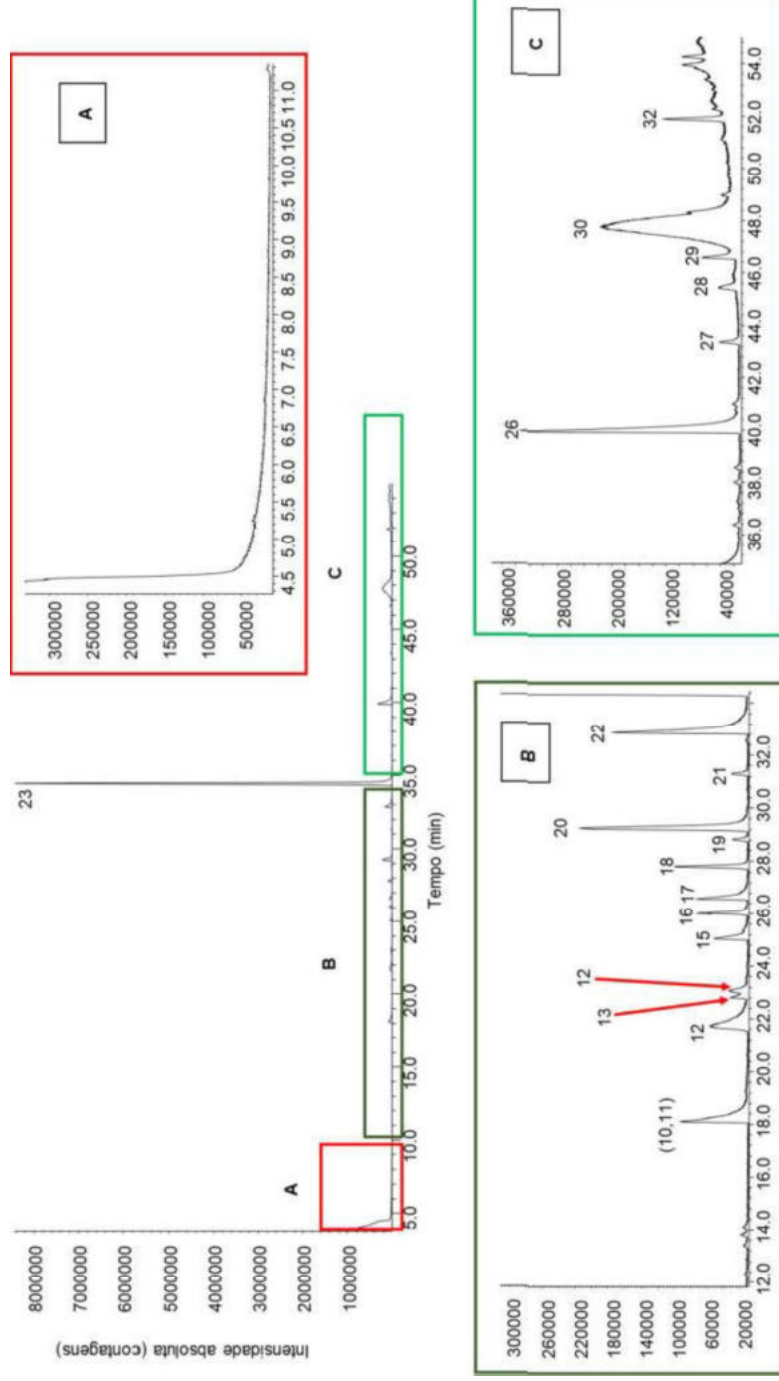
Legenda dos picos: **1)** 2-metilpropan-1-ol; **4)** 3-metilbutan-1-ol; **10)** furan-2-carbaldeído; **11)** ácido acético; **12)** butano-2,3-diol (isômero); **14)** propano-1,2-diol; **15)** ácido butanoico; **16)** furan-2-ilmetanol; **17)** ácido 2-metilbutanoico; **18)** 3-metilsulfanilpropan-1-ol; **20)** decan-1-ol D₂₁ (PI); **22)** ácido hexanoico; **23)** 2-feniletanol; **26)** ácido decanoico; **30)** ácido octanoico; **32)** 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído.

Figura 21 - TIC e regiões expandidas – **Marca 2** alcoólica.



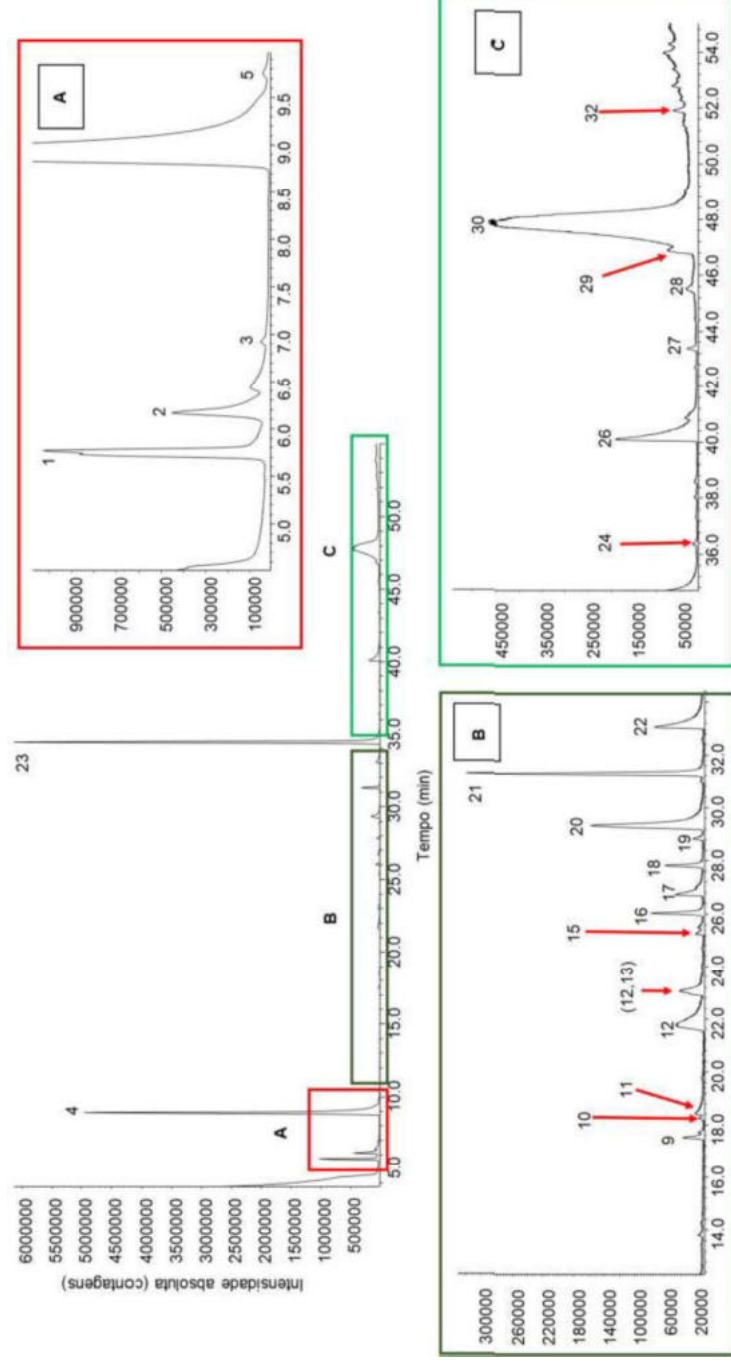
Legenda dos picos: **1)** 2-metilpropan-1-ol; **2)** etanoato de isopentila; **3)** butan-1-ol; **4)** 3-metilbutan-1-ol; **5)** hexanoato de isopentila; **7)** 2-hidroxi-propanoato de etila; **9)** octanoato de etila; **10)** furan-2-carbaldeído; **11)** ácido acético; **12)** butano-2,3-diol (isômero); **13)** ácido 2-metilpropanoico; **15)** ácido butanoico; **16)** furan-2-ilmetanol; **17)** ácido 2-metilbutanoico **18)** 3-metilsulfanilpropan-1-ol; **19)** 4-hidroxi-2-onas; **20)** decan-1-ol **D₂₁** (PI); **21)** acetato de 2-feniletila; **22)** ácido hexanoico; **23)** 2-feniletanol; **24)** (1H-pirrol-2-il)-etanona; **25)** 4-hidroxi-2,5-dimetilfuran-3-onas; **26)** ácido octanoico; **27)** 2-metoxi-4-vinilfenol; **28)** 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-onas; **29)** ácido decanoico; **30)** 4-hidroxi-fenil-etil álcool; **32)** 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído.

Figura 22 - TIC e regiões expandidas – **Marca 2** não alcoólica.



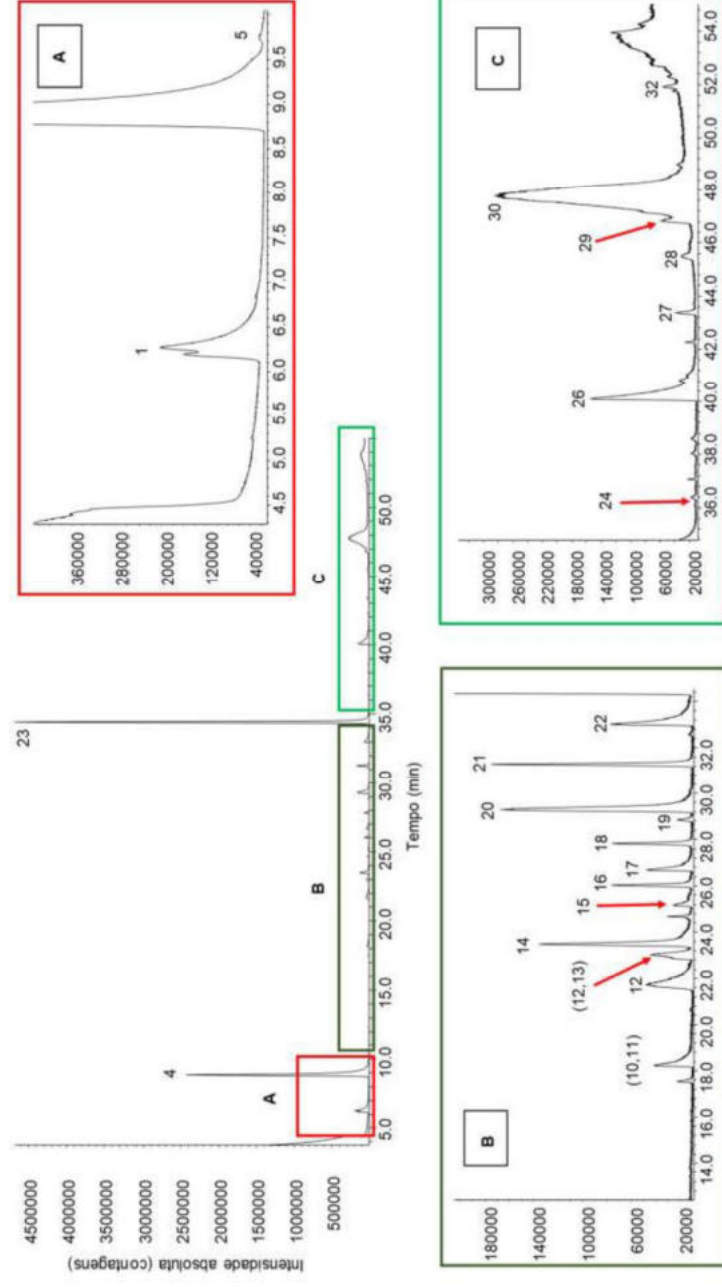
Legenda dos picos: **10)** furan-2-carbaldeído; **11)** ácido acético; **12)** butano-2,3-diol (isômero); **13)** ácido 2-metilpropanoico;; **15)** ácido butanoico; **16)** furan-2-ilmetanol; **17)** ácido 2-metilbutanoico; **18)** 3-metilsulfanilpropan-1-ol; **19)** 4-hidroxibutan-2-ona; **20)** decan-1-ol D₂₁ (PI); **22)** ácido hexanoico; **23)** 2-feniletanol; **26)** ácido octanoico; **27)** 2-metoxi-4-vinil-fenol; **28)** 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona; **29)** ácido decanoico; **30)** ácido decanoico **32)** 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído.

Figura 23 -TIC e regiões expandidas – **Marca 3** alcoólica.



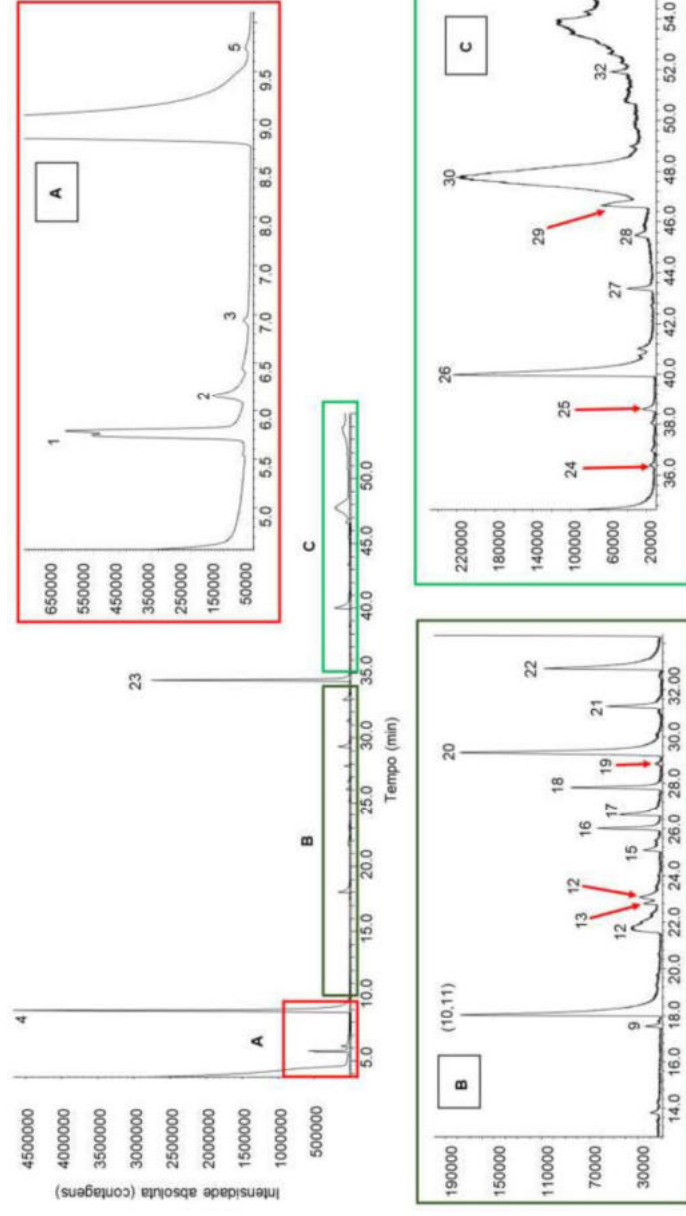
Legenda dos picos: 1) 2-metilpropan-1-ol; 2) etanoato de isopentila; 3) butan-1-ol; 4) 3-metilbutan-1-ol; 5) hexanoato de isopentila; 9) octanoato de etila; 10) furan-2-carbaldeído; 11) ácido acético; 12) butano-2,3-diol (isômero); 13) ácido 2-metilpropanoico; 15) ácido butanoico; 16) furan-2-ilmetanol; 17) ácido 2-metilbutanoico 18) 3-metilsulfanilpropan-1-ol; 19) 4-hidroxibutan-2-ona; 20) decan-1-ol D₂₁ (PI); 21) acetato de 2-feniletila; 22) ácido hexanoico; 23) 2-feniletanol; 24) (1H-pirrol-2-il)-etanona; 26) ácido octanoico; 27) 2-metoxi-4-vinilfenol; 28) 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona; 29) ácido decanoico; 30) 4-hidroxifeniletil álcool; 32) 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído.

Figura 24 - TIC e regiões expandidas – **Marca 3** não alcoólica.



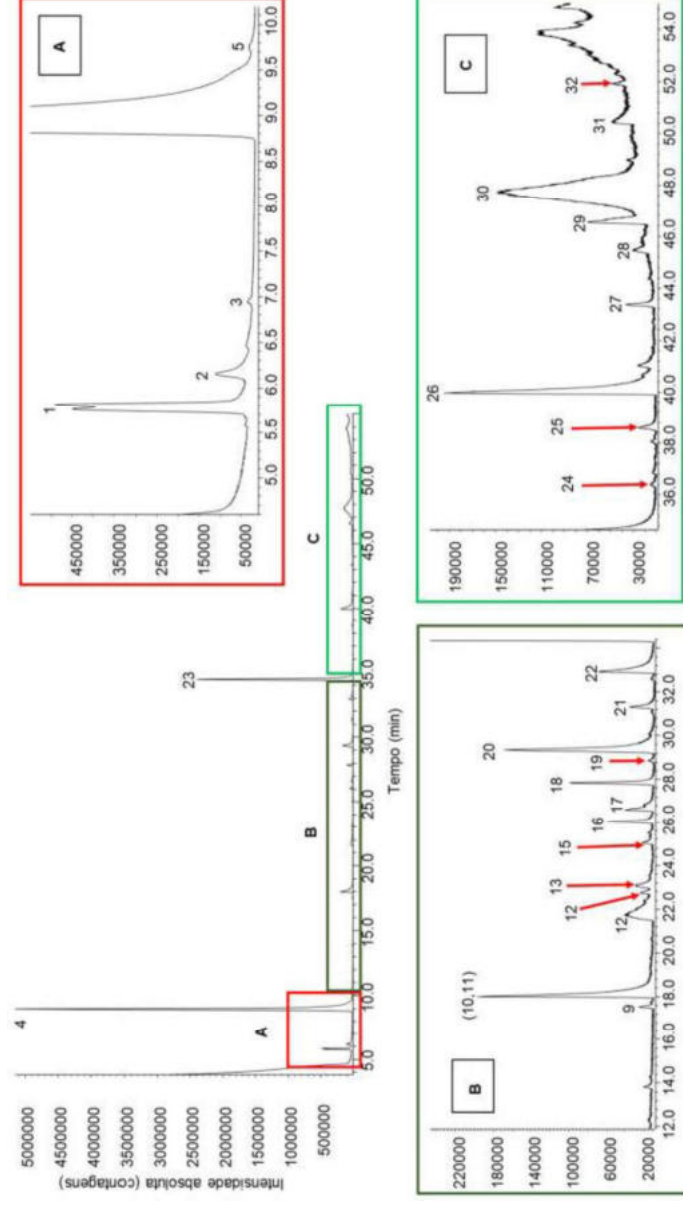
Legenda dos picos: **1)** 2-metilpropan-1-ol; **4)** 3-metilbutan-1-ol; **5)** hexanoato de isopentila; **10)** furan-2-carbaldeído; **11)** ácido acético; **12)** butano-2,3,3-diol (isômero); **13)** ácido 2-metilpropanoico; **14)** propano-1,2-diol; **15)** ácido butanoico; **16)** furan-2-ilmetanol; **17)** ácido 2-metilbutanoico **18)** 3-metilsulfanilpropan-1-ol; **19)** 4-hidroxibutan-2-ona; **20)** decan-1-ol D₂₁ (PI); **21)** acetato de 2-feniletila; **22)** ácido hexanoico; **23)** 2-feniletanol; **24)** (1H-pirrol-2-il)-etanona; **26)** ácido octanoico; **27)** 2-metoxi-4-vinilfenol; **28)** 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona; **29)** ácido decanoico; **30)** 4-hidroxifeniletil álcool; **32)** 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído.

Figura 25 - TIC e regiões expandidas – **Marca 4** alcoólica e com glúten.



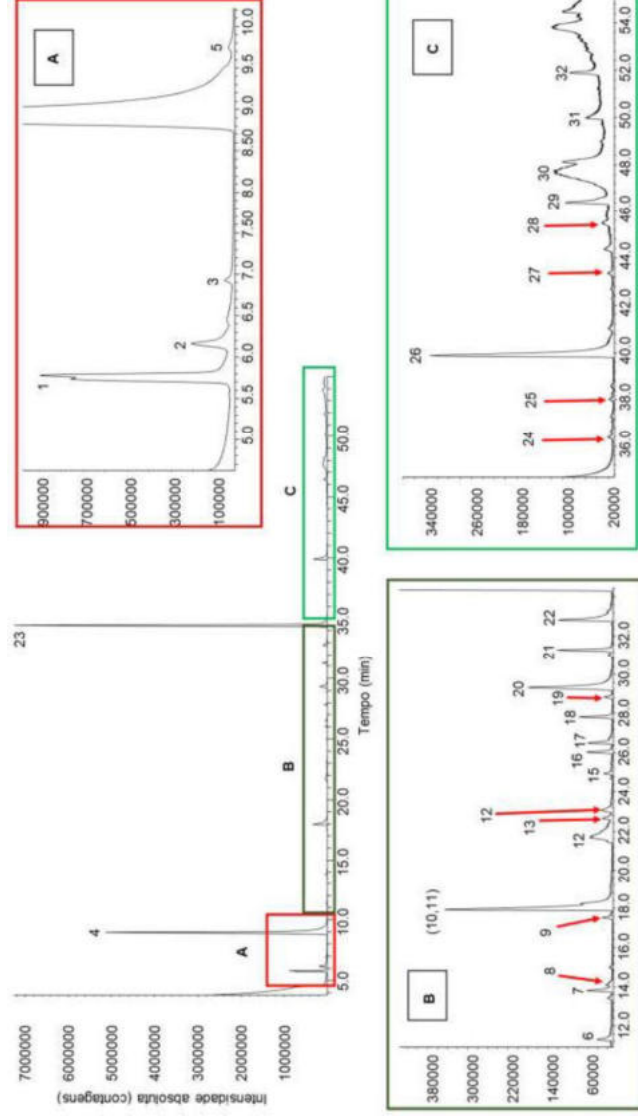
Legenda dos picos: **1)** 2-metilpropan-1-ol; **2)** etanoato de isopentila; **3)** butan-1-ol; **4)** 3-metilbutan-1-ol; **5)** hexanoato de isopentila; **9)** octanoato de etila; **10)** furan-2-carbaldeído; **11)** ácido acético; **12)** butano-2,3-diol (isômero); **13)** ácido 2-metilpropanoico; **15)** ácido butanoico; **16)** furan-2-ilmetanol; **17)** ácido 2-metilbutanoico **18)** 3-metilsulfanilpropan-1-ol; **19)** 4-hidroxi-2,5-dimetilfuran-3-ona; **20)** decan-1-ol D₂₁ (PI); **21)** acetato de 2-feniletila; **22)** ácido hexanoico; **23)** 2-feniletanol; **24)** (1H-pirrol-2-il)-etanona; **25)** 4-Hidroxi-2,5-dimetilfuran-3-ona; **26)** ácido octanoico; **27)** 2-metoxi-4-vinilfenol; **28)** 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona; **29)** ácido decanoico; **30)** 4-hidroxifenil-etil álcool; **32)** 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído.

Figura 26 - TIC e regiões expandidas – Marca 4 alcoólica e sem glúten.



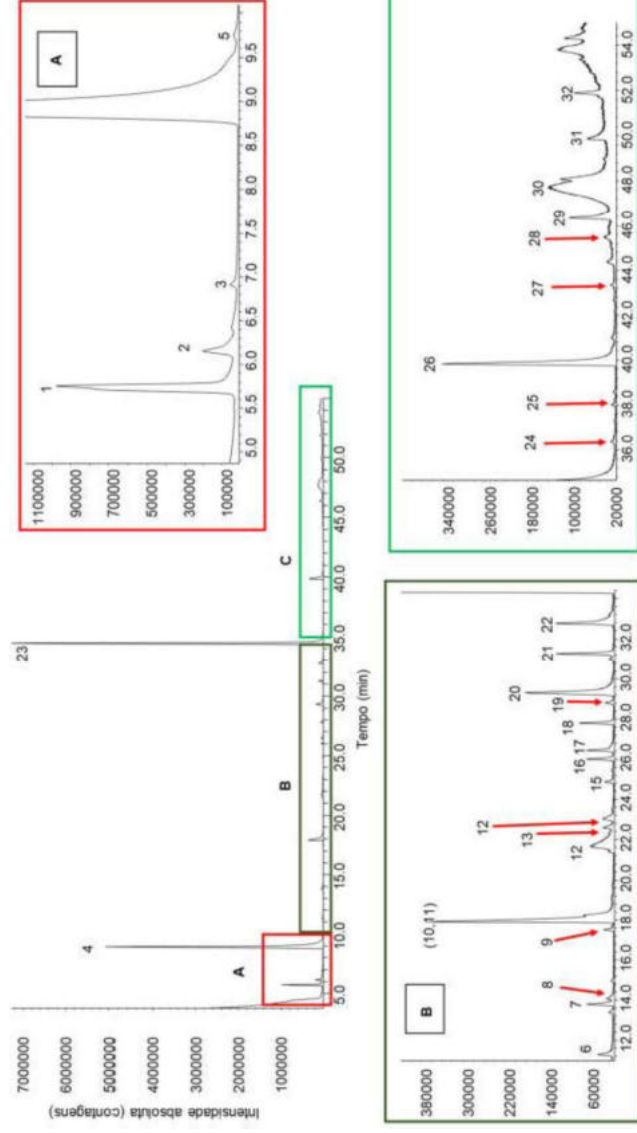
Legenda dos picos: 1) 2-metilpropan-1-ol; 2) etanoato de isopentila; 3) butan-1-ol; 4) 3-metilbutan-1-ol; 5) hexanoato de isopentila; 9) octanoato de etila; 10) furan-2-carbaldeído; 11) ácido acético; 12) butano-2,3-diol (isômero); 13) ácido 2-metilpropanoico; 15) ácido butanoico; 16) furan-2-ilmetanol; 17) ácido 2-metilbutanoico 18) 3-metilsulfanilpropan-1-ol; 19) 4-hidroxibutan-2-ona; 20) decan-1-ol D₂₁ (PI); 21) acetato de 2-feniletila; 22) ácido hexanoico; 23) 2-feniletanol; 24) (1H-pirrol-2-il)-etanona; 25) 4-Hidroxi-2,5-dimetilfuran-3-ona; 26) ácido octanoico; 27) 2-Metoxi-4-vinilfenol; 28) 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona; 29) ácido decanoico; 30) Ácido 4-etoxi-4-oxobutanoico; 31) 4-Hidroxifeniletil álcool; 32) 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído.

Figura 27 - TIC e regiões expandidas – **Marca 5** alcoólica e com glúten



Legenda dos picos: **1)** 2-metilpropan-1-ol; **2)** etanoato de isopentila; **3)** butan-1-ol; **4)** 3-metilbutan-1-ol; **5)** hexanoato de isopentila; **6)** 3-hidroxibutan-2-ona; **7)** 2-hidroxipropanoato de etila; **8)** 2-hidroxipentan-3-ona; **9)** octanoato de etila; **10)** furan-2-carbaldeído; **11)** ácido acético; **12)** butano-2,3-diol (isômero); **13)** ácido 2-metilpropanoico; **15)** ácido butanoico; **16)** furan-2-ilmetanol; **17)** ácido 2-metilbutanoico **18)** 3-metilsulfanilpropan-1-ol; **19)** 4-hidroxibutan-2-ona; **20)** decan-1-ol D₂₁ (PI); **21)** acetato de 2-feniletila; **22)** ácido hexanoico; **23)** 2-feniletanol; **24)** (1H-pirrol-2-il)-etanona; **25)** 4-hidroxi-2,5-dimetilfuran-3-ona; **26)** ácido octanoico; **27)** 2-metoxi-4-vinilfenol; **28)** 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona; **29)** ácido decanoico; **30)** ácido 4-etoxi-4-oxobutanoico; **31)** 4-hidroxifeniletil álcool; **32)** 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído.

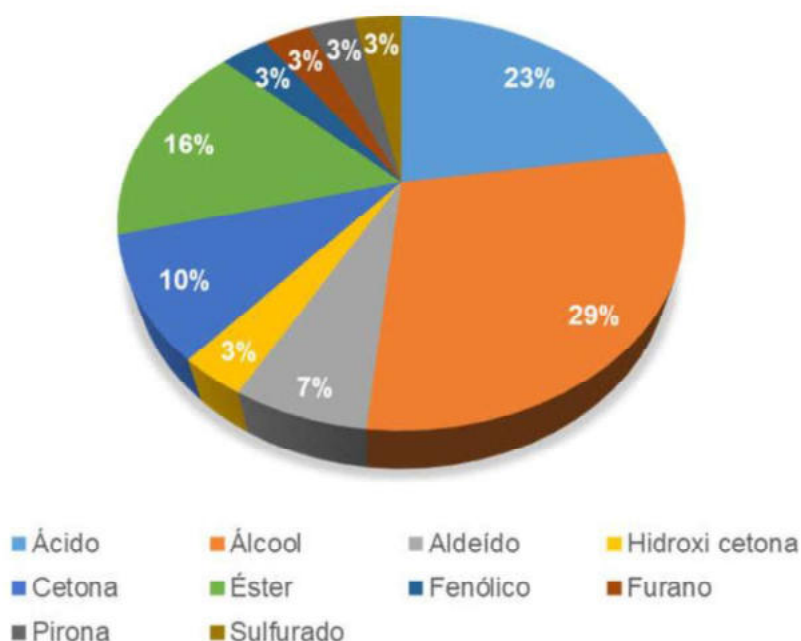
Figura 28 - TIC e regiões expandidas – **Marca 5** alcoólica e sem glúten



Legenda dos picos: **1)** 2-metilpropan-1-ol; **2)** etanoato de isopentila; **3)** butan-1-ol; **4)** 3-metilbutan-1-ol; **5)** hexanoato de isopentila; **6)** 3-hidroxibutan-2-ona; **7)** 2-hidroxipropanoato de etila; **8)** 2-hidroxipentan-3-ona; **9)** octanoato de etila; **10)** furan-2-carbaldeído; **11)** ácido acético; **12)** butano-2,3-diol (isômero); **13)** ácido 2-metilpropanoico; **15)** ácido butanoico; **16)** furan-2-ilmetanol; **17)** ácido 2-metilbutanoico **18)** 3-metilsulfanilpropan-1-ol; **19)** 4-hidroxibutan-2-ona; **20)** decan-1-ol D₂₁ (PI); **21)** acetato de 2-feniletila; **22)** ácido hexanoico; **23)** 2-feniletanol; **24)** (1H-pirrol-2-il)-etanona; **25)** 4-hidroxi-2,5-dimetilfuran-3-ona; **26)** ácido octanoico; **27)** 2-metoxi-4-vinilfenol; **28)** 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona; **29)** ácido decanoico; **30)** ácido 4-etoxi-4-oxobutanoico; **31)** 4-hidroxifenil-etil álcool; **32)** 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído.

Dentre as classes químicas das substâncias identificadas nos perfis cromatográficos (**Figuras 19-28**), aquela com o maior número de ocorrência foram os álcoois, seguido dos ácidos e dos ésteres (**Figura 29**). Vale salientar que as informações contidas no gráfico fazem referência apenas às classes identificadas em todas as amostras analisadas neste estudo. A classe dos álcoois não inclui o etanol.

Figura 29 - Gráfico de pizza das diferentes classes químicas presentes no perfil químico cervejeiro e suas porcentagens.



Dentre os álcoois identificados podemos destacar o butan-1-ol, 2-metilpropan-1-ol, 2-feniletanol e o 3-metilbutan-1-ol. Dependendo da concentração, estes compostos podem ter impacto positivo ou negativo no aroma e no sabor da cerveja. A alta concentração ($>300 \text{ mg L}^{-1}$) de álcoois de cadeia longa (maior que quatro átomos carbonos) pode levar a um gosto forte e sabor pungente, ao contrário que, níveis ótimos acarretam características desejáveis (DONG *et al.*, 2015).

A média dos resultados de concentração foi obtida pelo método de padronização interna e da análise em triplicata das amostras. Estes resultados são apresentados na **Tabela 13**.

Tabela 13 - Média da concentração relativa (mg L⁻¹) dos compostos identificados para cada uma das marcas comerciais avaliadas (numeradas de 1 a 5).

#	Nome do composto	Concentração (mg L ⁻¹)									
		1	1 sem	2	2 sem	3	3 sem	4 com	4 sem	5 com	5 sem
		alcoólica	álcool	alcoólica	álcool	alcoólica	álcool	glúten	glúten	glúten	glúten
1	2-metilpropano-1-ol	14575,0	3263,7	17243,2	n.d.	24428,9	10615,4	14670,0	13451,9	22209,6	22430,2
2	etanoato de isopentila	303,9	n.d.	5250,3	n.d.	10415,4	n.d.	2247,3	1751,2	4107,9	3799,1
3	butan-1-ol	508,2	n.d.	396,7	n.d.	376,6	n.d.	302,9	232,9	597,1	625,8
4	3-metilbutan-1-ol	189038,7	75731,9	201920,3	n.d.	221037,9	116942,5	208284,8	229429,4	226070,0	224197,8
5	hexanoato de etila	498,9	n.d.	731,9	n.d.	543,0	169,3	283,6	194,3	464,2	491,8
6	3-hidroxibutan-2-ona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1119,1	1155,0
7	2-hidroxipropanoato de etila	189,3	n.d.	628,3	n.d.	214,8	n.d.	285,4	323,1	1724,1	1734,8
8	2-hidroxipentan-3-ona	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	240,7	331,6
9	octanoato de etila	751,4	n.d.	704,7	n.d.	759,1	n.d.	430,5	481,1	616,3	541,3
10	furan-2-carbaldeído	69,5	125,9	65,8	156,8	106,4	76,1	98,8	83,8	2008,4	322,8
11	ácido acético	3427,8	3248,5	351,6	1090,9	236,2	529,9	2811,5	3083,1	4723,9	5464,1
12	butano-2,3-diol	3757,0	1391,2	2098,9	3252,9	2837,1	2803,1	1880,8	2528,3	3517,1	3425,4
13	ácido 2-metilpropanoico	n.d.	n.d.	87,7	n.d.	146,9	140,7	113,2	87,6	132,2	136,0
12	butano-2,3-diol	1294,6	449,6	507,1	706,2	863,3	95,9	523,9	674,8	2629,7	7359,0
14	propano-1,2-diol	n.d.	7377,0	n.d.	n.d.	n.d.	5756,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
15	ácido butanoico	305,3	99,3	477,2	889,5	169,5	260,6	209,6	171,8	250,8	248,5
16	furan-2-ilmetanol	1461,7	557,5	1430,9	1992,7	2198,7	2092,1	1746,1	1687,9	1713,1	1742,1
17	ácido 2-metilbutanoico	391,1	103,8	382,3	584,3	367,2	413,7	263,6	216,3	367,9	364,9
18	3-metilsulfanilpropan-1-ol	343,3	274,5	2025,2	2872,3	1553,0	1979,8	2564,6	2981,9	2109,9	2150,3
19	4-hidroxi-2-butanona	n.d.	n.d.	484,3	626,5	407,6	392,1	184,4	281,3	601,9	672,5
21	acetato de 2-feniletila	1794,3	n.d.	4057,9	680,4	9844,9	5326,8	1758,1	1097,2	3350,7	3362,9
22	ácido hexanoico	1294,7	427,8	1653,3	3225,7	1234,3	1727,1	2043,8	1390	1937,4	1904,0
23	2-feniletanol	60297,8	46323,6	72675,6	119192,	87790,7	65244,3	40723,9	36126,6	104498,2	104392,6

#	Nome do composto	Concentração (mg L ⁻¹)									
		1 alcoólica	1 sem álcool	2 alcoólica	2 sem álcool	3 alcoólica	3 sem álcool	4 com glúten	4 sem glúten	5 com glúten	5 sem glúten
24	1-(1H-pirrol-2-il)-etanona	242,9	n.d.	242,7	468,2	305,9	243,24	193,9	204,3	317,6	295,
25	4-hidroxi-2,5-dimetilfuran-3-ona	n.d.	n.d.	2945,5	n.d.	n.d.	n.d.	519,8	827,4	341,5	239,9
26	ácido octanoico	2482,1	394,1	2945,5	4039,6	2947,0	2359,4	3125,5	2592,7	3635,9	3573,8
27	2-metoxi-4-vinilfenol	792,1	n.d.	601,1	1040,2	700,8	933,8	904,6	948,0	407,1	329,1
28	2,3-dihidro-3,5-dihidroxi--6-metil-4H-piran-4-ona	704,9	n.d.	631,0	1391,5	920,6	858,9	645,1	657,1	n.d.	628,0
29	ácido decanoico	432,9	n.d.	481,1	252,1	318,6	194,8	377,1	384,9	450,5	442,2
30	4-Hidroxifeniletíl álcool (Tyrosol)	n.d.	19142,3	14318,6	27174,1	63932,0	37591,5	26826,9	17194,5	12500,0	16213,8
31	ácido 4-etoxi-4-oxobutanoico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	451,7	1647,3	1835,5	2374,9
32	5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído	579,7	1895,9	974,4	3123,3	954,2	727,4	605,6	509,1	1740,6	2030,8

n.d= não detectado

É possível observar a partir dos dados apresentados na **Tabela 13** que o hexan-1-ol, por exemplo, mesmo quando encontrado em concentrações baixas ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$), tem aroma herbáceo e rançoso, que é relatado como efeito negativo nas bebidas (DONG *et al.*, 2015). O 3-metil-butan-1-ol, composto identificado com a maior concentração ($229,43 \text{ mg L}^{-1}$), possui a maior importância para o aroma, tornando a cerveja agradável para o consumo (OLANIRAN *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2020). O mesmo pôde ser observado por ALVES, GONÇALVES, *et al.*, 2020, que estudaram o *fingerprint* de compostos voláteis da cerveja em diferentes etapas da fermentação. Depois do etanol, o 3-metilbutan-1-ol, também conhecido como álcool isoamílico, foi o álcool mais abundante e que influenciou no sabor da cerveja. Segundo relatado por análise sensorial, o sabor da cerveja se torna mais “pesado” à medida que o teor de 3-metilbutan-1-ol aumenta.

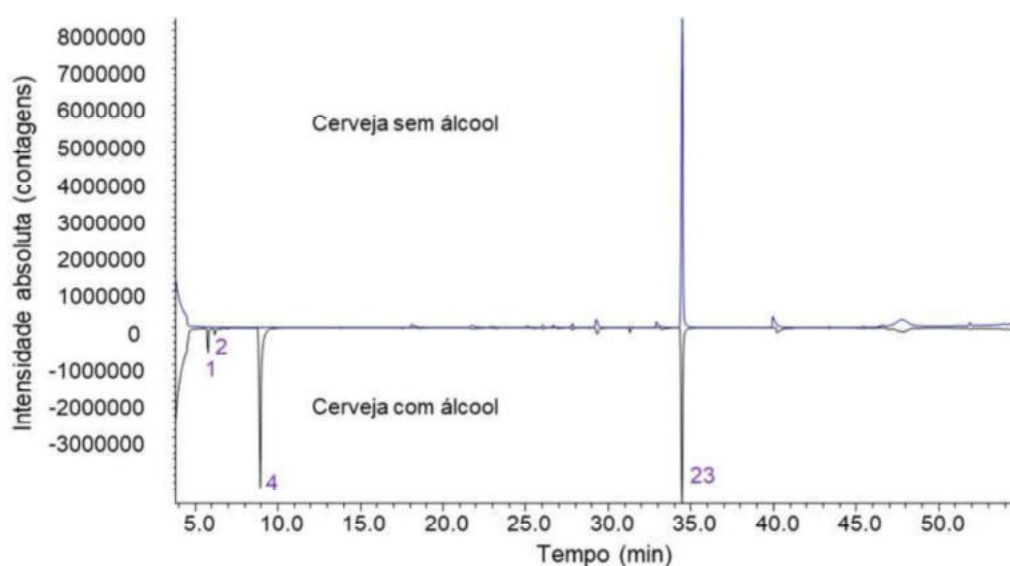
Os álcoois são importantes marcadores químicos da etapa de fermentação, pois são formados pelo metabolismo das leveduras a partir da síntese de aminoácidos, provenientes do piruvato, através da via anabólica ou produzido pelo catabolismo de aminoácido. Ao observar a presença do composto butano-2,3-diol é possível afirmar que todas as amostras passaram pelo processo de fermentação. Comparando as amostras classificadas comercialmente como “sem álcool” com as alcoólicas, nota-se que a concentração do 2-metilpropan-1-ol, também chamado de isobutanol, diminui cerca de 80% para **Marca 1**. Já para a **Marca 2** o composto não foi detectado e para a **Marca 3** ocorreu uma diminuição de aproximadamente 60%. O butan-1-ol não foi detectado para nenhuma das marcas sem álcool demonstrando que houve a perda desse composto durante o processo de remoção do etanol. O 3-metilbutan-1-ol tem grande importância em termos quantitativos para o aroma da cerveja. Nas cervejas alcoólicas as concentrações desse composto praticamente se equivalem, entretanto para as CSA é possível observar a diminuição significativa na concentração, chegando a não ser detectado na **Marca 2** e para as **Marcas 1 e 3** houve uma diminuição de 60 e 50%, respectivamente. Segundo o estudo de (RETTBERG *et al.*, 2022) realizado em cervejas estilo Pilsner, foi quantificado 31 mg L^{-1} de 3-metil-1-butanol em uma amostra de cerveja sem álcool, enquanto a literatura aponta concentração de aproximadamente 50 mg L^{-1} em cervejas alcoólicas (SCHIEBERLE, 1991).

A partir dos dados apresentados na **Tabela 13**, é possível concluir que a **Marca 2** é a que mais se distancia do seu equivalente alcoólico e as **Marcas 1 e 3** conseguem manter as características do aroma proporcionado por esse composto sem prejuízo no teor alcoólico.

Outro composto que vale ressaltar é o 2-feniletanol, pois seu aroma característico de pétalas de rosas apresenta grande impacto na característica sensorial do produto. Observando as concentrações obtidas podemos destacar a CSA da **Marca 2**, em que houve um aumento de 40% em relação ao equivalente alcoólico. Para as **Marcas 1 e 3** houve diminuição de 30% indicando que para **Marca 2** esse composto pode ter sido utilizado como adjunto cervejeiro.

Uma avaliação entre a CSA e seu equivalente alcoólico pode ser observado na **Figura 30** na qual se torna evidente a discrepância entre os produtos. Essa diferença se evidencia sobretudo no início do cromatograma pela ausência dos compostos 2-metilpropan-1-ol (1), etanoato de isopentila (2) e 3-metilbutan-1-ol (4). A ausência de ésteres na CSA pode ser considerada como um indicativo de um produto de qualidade sensorial baixa, visto que essa classe química tem importante papel no aroma e no sabor do produto final.

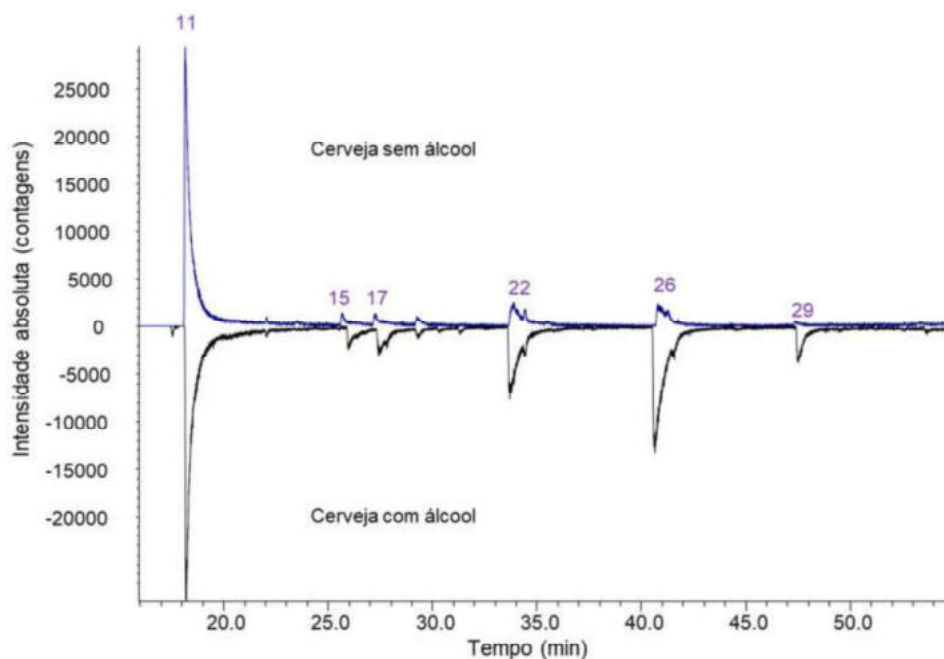
Figura 30 - TIC comparativo entre os perfis das cervejas com e sem álcool da **Marca 2**, sendo 1) 2-metilpropan-1-ol; 2) etanoato de isopentila; 4) 3-metilbutan-1-ol; 23) 2-feniletanol.



O hexanoato de etila (composto 5) evidencia o comportamento geral dos ésteres nas marcas avaliadas. Nesse sentido, a **Marca 3** se destaca por manter esse composto, mesmo que em menor concentração ($169,3 \text{ mg L}^{-1}$) em relação ao equivalente alcoólico. O acetato de 2-feniletila foi detectado em todas CSA, exceto na **Marca 1**. Vale ressaltar que para a **Marca 1** esse composto está em menor concentração ($1794,3 \text{ mg L}^{-1}$) nos equivalentes alcoólicos quando comparado às **Marcas 2 e 3**, isso pode explicar a ausência completa após o processo de remoção do etanol.

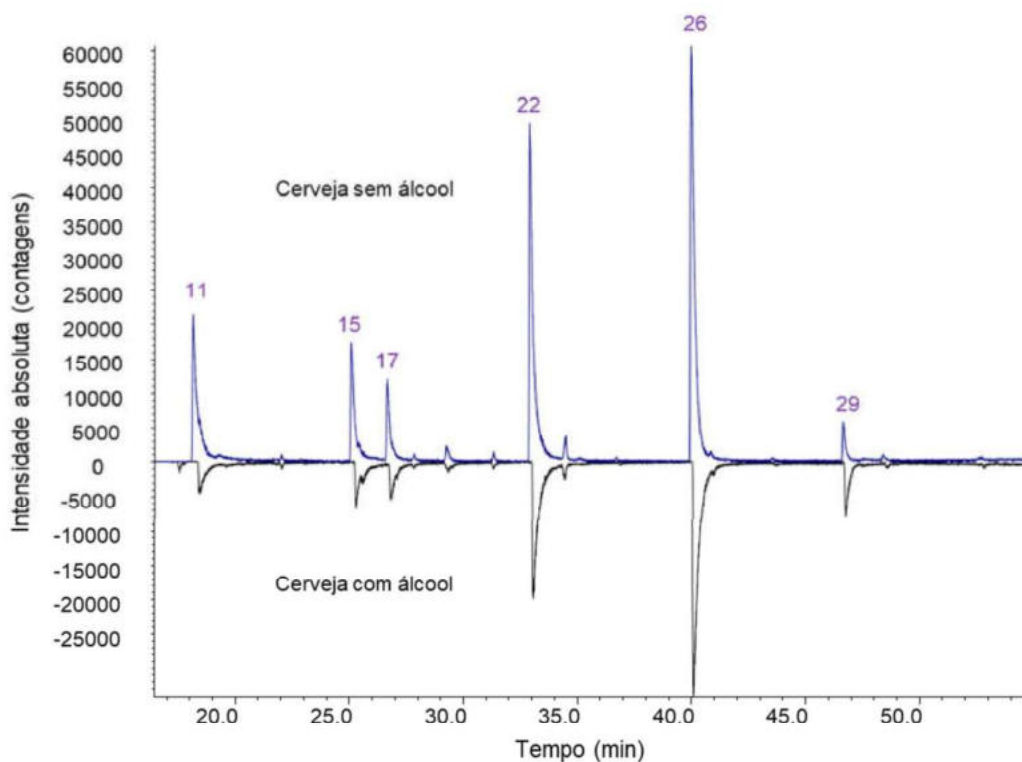
A classe dos ácidos se destacou em termos de porcentagem de compostos identificados, sendo a terceira mais abundante (23%) (**Figura 29**). O processo de remoção de etanol afetou de maneira quantitativa o perfil dessa classe química, no entanto, a maioria dos compostos foram preservados, como o 3-metilnutan-1-ol. Para a **Marca 1** (**Figura 31**) o ácido acético (11) se manteve nos mesmos níveis de concentração do similar alcoólico, enquanto houve um decréscimo significativo para os demais, a ponto de o ácido decanoico (29) não estar presente na CSA.

Figura 31 - Comparação dos CIE (m/z 60) referente aos ácidos orgânicos da **Marca 1**, sendo 11) ácido acético; 15) ácido butanoico; 17) ácido 2-metilbutanoico; 22) ácido hexanoico; 26) ácido octanoico; 29) ácido decanoico.



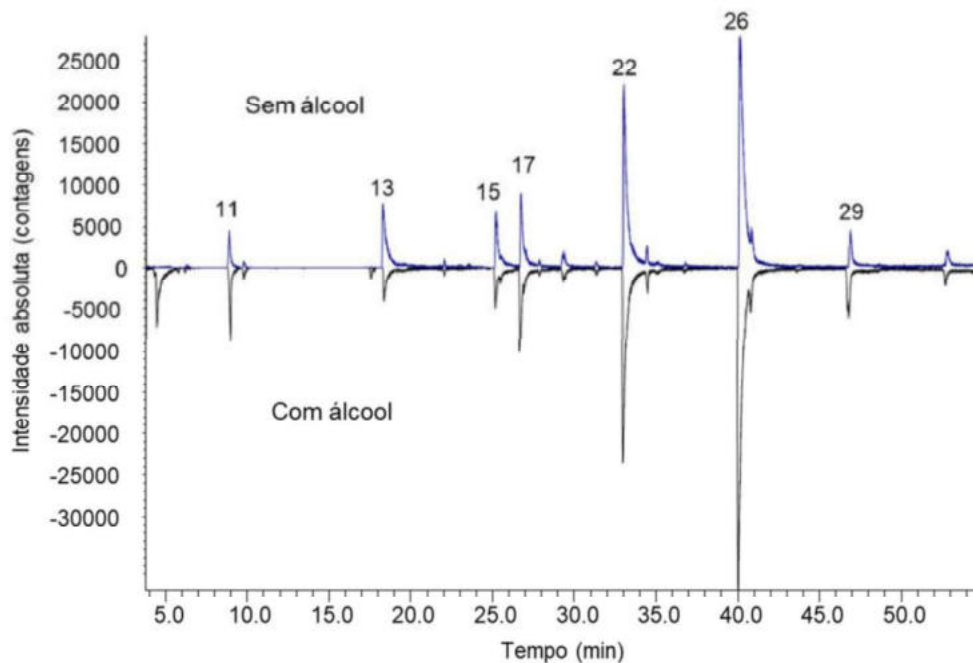
No caso da **Marca 2** observou-se um aumento na concentração dos ácidos, diferentemente do que foi observado na **Marca 1**. Esse aumento foi mais acentuado para o ácido acético (11). Esse aumento pode estar relacionado à utilização de diferentes matérias-primas na produção do mosto cervejeiro para a **Marca 2**. O equivalente alcoólico dessa marca utilizou uma porcentagem de cereais não maltados o que pode ter influenciado na síntese dos ácidos ou eles foram utilizados como adjuntos para corrigir o aroma, o sabor e a acidez (**Figura 32**).

Figura 32 - Comparação dos CIE (m/z 60) referente aos ácidos orgânicos da **Marca 2** sendo 11) ácido acético; 15) ácido butanoico; 17) ácido 2-metilbutanoico; 22) ácido hexanoico; 26) ácido octanoico; 29) ácido decanoico.



A **Marca 3** manteve seu perfil de ácidos equivalente quando comparado à CSA e seu equivalente alcoólico, merecendo destaque para o ácido acético que aumentou em cerca de 80% em relação ao equivalente alcoólico (**Tabela 13**). Sendo assim pode-se indicar que os produtos alcoólicos e não alcoólicos da **Marca 3** apresentam a maior semelhança entre o perfil dos ácidos em termos de intensidade dos picos cromatográficos (**Figura 33**).

Figura 33 - Comparação dos CIE (m/z 60) referente aos ácidos orgânicos da **Marca 3**, sendo 11) ácido acético; 13) ácido 2-metil-propanoico; 15) ácido butanoico; 17) ácido 2-metilbutanoico; 22) ácido hexanoico; 26) ácido octanoico; 29) ácido decanoico.



Um aspecto importante observado é que as cervejas com e sem glúten apresentaram perfis cromatográficos similares, tanto para a **Marca 4 (Figura 34)**, quanto para a **Marca 5**. Essas diferenças podem estar relacionadas ao processo de produção da cerveja. Os fabricantes das **Marcas 4 e 5** informam em sua embalagem que a remoção do glúten é realizada através de processo enzimático o que explica a similaridade entre perfis dos seus produtos com glúten. Visto que nesse processo se utilizaram as mesmas matérias-primas (**Figura 34 e Figura 35**).

Figura 34 - TIC comparativo entre os perfis das cervejas com e sem glúten da **Marca 4** sendo 1) 2-metilpropan-1-ol; 4) 3-metilbutan-1-ol; 23) 2-feniletanol.

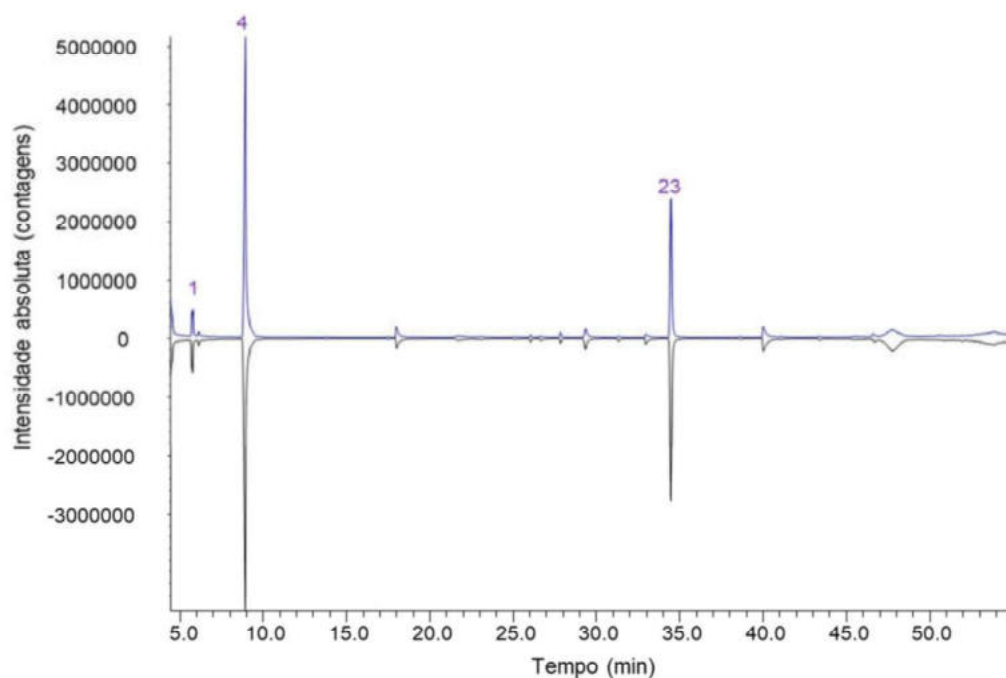
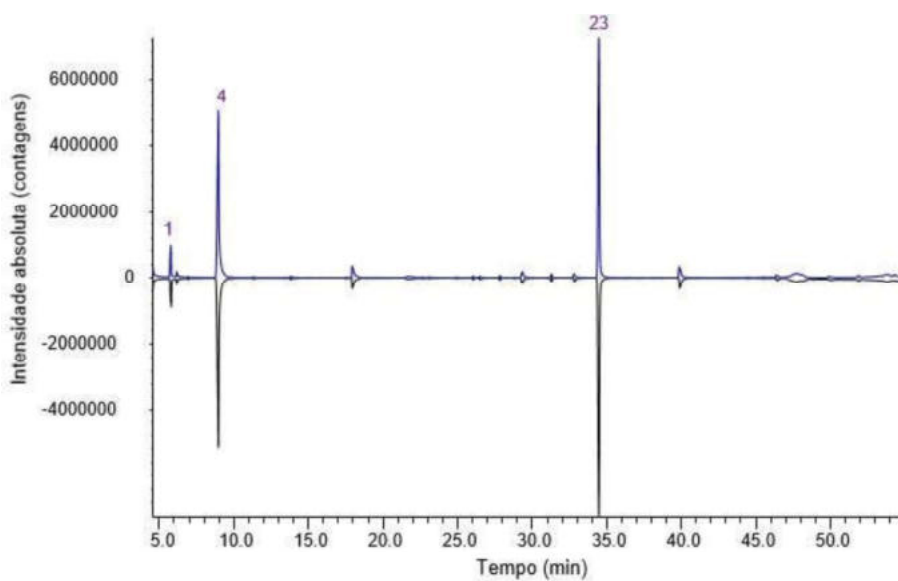


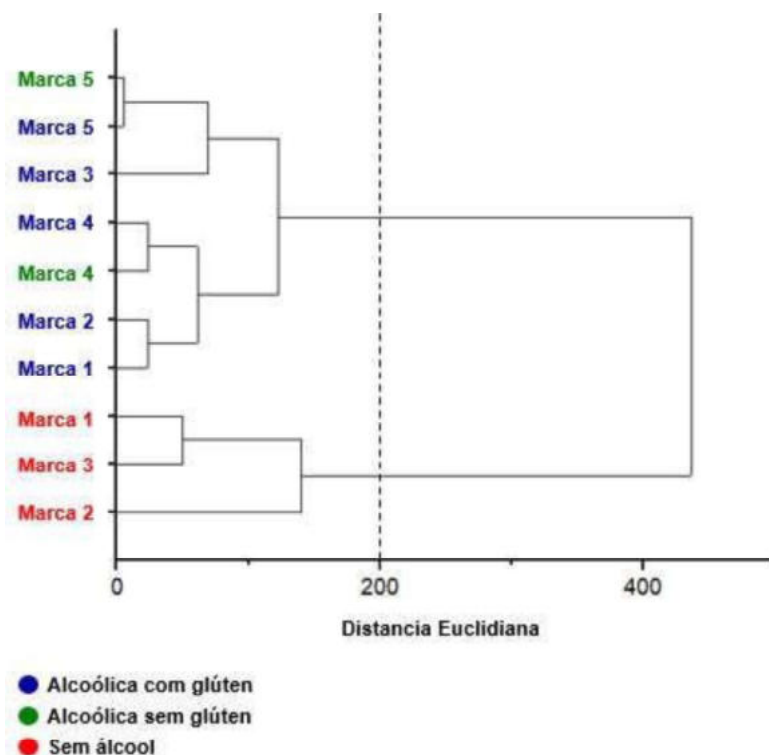
Figura 35 - TIC comparativo entre os perfis das cervejas com e sem glúten da **Marca 5** sendo 1) 2-metilpropan-1-ol; 4) 3-metilbutan-1-ol; 23) 2-feniletanol.



6.4 ANÁLISE MULTIVARIADA

A análise hierárquica de agrupamentos (HCA) teve por objetivo avaliar as similaridades dos perfis químicos das amostras (cervejas comerciais) em estudo. Por esta análise a um nível de confiança de 95%, foi observada a formação de dois grupos principais (**Figura 36**). No grupo das cervejas com álcool podemos observar a formação de dois subgrupos que englobam as cervejas com e sem glúten.

Figura 36 - Similaridade de perfil químico analisado através de Dendograma da análise hierárquica de agrupamentos (HCA) – método de Ward com distância euclidiana para amostras de cervejas comerciais alcoólica com glúten, alcoólica sem glúten e sem álcool.



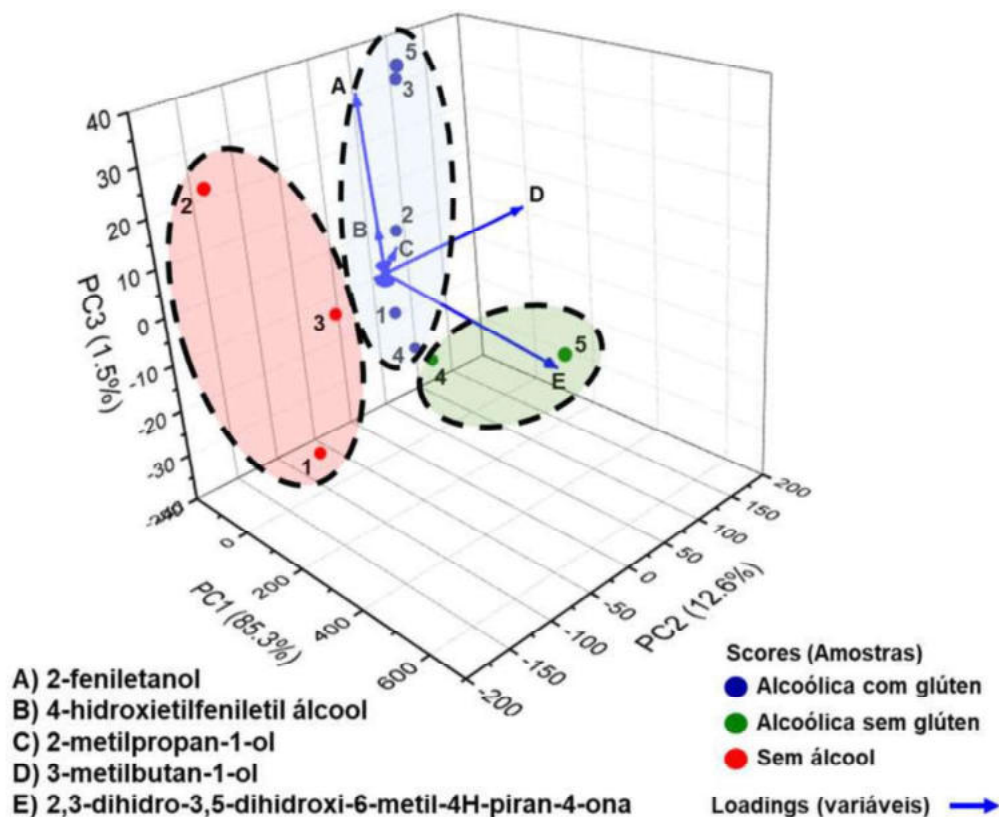
Neste grupo as **Marcas 4 e 5** apresentaram a maior similaridade entre seus produtos com e sem glúten. Avaliando a distância Euclidiana nestes pares de amostra é possível observar que a **Marca 5** possui maior similaridade entre seus pares, visto que a distância é maior para marca 4 do que para marca 5. O

subgrupo referente à **Marca 5**, com e sem glúten, e à **Marca 3** com álcool fazem parte das marcas puro malte. Já as **Marcas 1, 2 e 3** estão enquadradas no subgrupo das marcas que contêm cereais não maltados.

O segundo grupo engloba as marcas sem álcool e a maior semelhança está evidenciada entre as **Marcas 1 e 3**. A formação desse grupo demonstra que os resultados qualitativos dos perfis químicos discutidos anteriormente, de fato representam modificações estatisticamente significativas. Considerando a **Figura 36**, onde é possível observar um menor número de compostos (21) identificados para a **Marca 2** o que corrobora sua menor semelhança com as **Marcas 1 e 3**. A similaridade do número de compostos identificados para as **Marcas 1 e 3** confirmam que os processos preservaram, de forma mais eficiente, o perfil químico dos compostos voláteis e semivoláteis indicando produtos de melhor qualidade.

A análise de componentes principais (PCA) apresenta o mesmo padrão de agrupamentos que o HCA. As três primeiras componentes principais apresentam uma variância explicada de 99,4% o que evidencia a boa representatividade dos dados e agrupamentos apresentados. Pela análise de PCA é possível indicar marcadores químicos para os agrupamentos. Deste modo, dentre os 31 compostos identificados, cinco apresentaram maior significância no agrupamento das amostras, sendo eles 2-feniletanol, 4- hidroxietilfeniletil álcool, 2-metilpropan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol, 2,3-dihidro-3,5- dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (**Figura 37**).

Figura 37 - Análise de componentes principais, gráfico score vs loadings.



Pela análise de PCA os compostos 2-metilpropan-1-ol e 3-metilbutan-1-ol foram identificados como os principais marcadores para diferenciar as CSA dos seus similares alcoólicos. Os loadings C e D (2-metilpropan-1-ol e 3-metilbutan-1-ol) apontam na direção contrária dos scores representativos das cervejas sem álcool, sugerindo menor influência desses compostos nas CSA. O mesmo pôde ser observado por HORÁCIO et al., (2020) que avaliaram e compararam os perfis de aroma de cervejas sem álcool obtidas por destilação contínua a vácuo com diferentes pressões e processos. Verificaram que o processo de retirada de álcool na produção das CSA não apenas retira o etanol, mas também componentes aromáticos voláteis, como é o caso do 2-metilpropan-1-ol e 3-metilbutan-1-ol, que são parciais ou totalmente removidos da cerveja.

O composto 2-feniletanol (*loading* A) foi responsável por evidenciar as semelhanças entre as **Marcas 3 e 5** alcoólicas e com glúten. Tal composto contribui para o "sabor de rosa", predominante responsável pelo aroma de rosas. A produção de 2-feniletanol tem rendimento dependente do tipo de fonte de

nitrogênio e da concentração de aminoácidos aromáticos no meio de fermentação (HOLT *et al.*, 2019). A presença de tal composto está ligada diretamente à matéria-prima e fermento utilizados na produção da cerveja. Nesse caso, destaca-se o trigo sarraceno (BRASIL *et al.*, 2021) e a *Saccharomyces cerevisiae*, um dos principais microrganismos conhecidos do processo fermentativo da cerveja, por favorecerem a produção do 2-fenil-etanol (WANG *et al.*, 2018). Além desses fatores, processos que reutilizam o subproduto sólido dos grãos cervejeiros como substrato na fermentação, produz naturalmente o composto aromático 2-feniletanol por meio de fermentação microbiana, principalmente usando leveduras (MITRI *et al.*, 2022).

As **Marcas 1, 2 e 4** com álcool e com glúten, e a **Marcas 4** sem glúten, foram agrupadas pelos compostos 4-hidroxietilfeniletil álcool (*loading B*) e 2- metilpropan-1-ol (*loading C*), diferenciando-as das **Marcas 3 e 5**. Já o 2,3- dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona (*loading E*) se apresentou como o marcador para as cervejas sem glúten.

7 CONCLUSÃO

A partir da otimização dos parâmetros de análise cromatográfica e do método de extração utilizando o método DoE, foi possível obter um perfil químico abrangente. Os fatores mais significativos em um intervalo de confiança de 95% foram *(i)* a interação da vazão do gás de arraste e a temperatura inicial do forno na otimização cromatográfica, e *(ii)* a interação da quantidade de sal com a proporção solvente:amostra na otimização da ELL. A análise estatística dos dados obtidos para a otimização do método cromatográfico demonstrou a robustez do método, pois através do gráfico de Pareto foi possível observar que pequenas variações não influenciaram significativamente no perfil cromatográfico.

O perfil químico molecular obtido pelo método desenvolvido possibilitou, através de tratamento estatístico, a comparação entre 5 marcas de cervejas comerciais alcoólicas, não alcoólicas, com e sem glúten e assim obter o grau de similaridade entre elas. Foi observado que o processo de remoção do glúten não influenciou no perfil químico do seu similar, entretanto, para as amostras sem álcool houve uma diferença significativa em relação a alguns compostos, como por exemplo o 3-metilbutan-1-ol, o qual não foi detectado para a **Marca 2** sem álcool e as concentrações para a **Marca 1** e **3** sofreram alterações significativas para as amostras sem álcool. O processo de remoção do etanol impactou significativamente no perfil dos compostos mais voláteis, exceto para a **Marca 3**. A análise multivariada foi capaz de agrupar as diferentes marcas e produtos de acordo com o teor alcoólico e o processo de remoção do etanol e do glúten. Esse tipo de análise estatística, junto com a técnica CG-EM podem ser utilizadas como ferramentas para o acompanhamento do processo e no desenvolvimento de novas tecnologias de remoção do etanol.

O fluxograma de trabalho desenvolvido foi capaz de diferenciar perfis semelhantes, evidenciando a presença de marcadores químicos que têm papel importante na produção da cerveja. Tal estudo de perfil químico com uma abordagem estatística comparando cervejas de diferentes categorias ainda não foi relatado na literatura, tornando o trabalho relevante para a indústria, pois é possível avaliar como os marcadores químicos produzidos em diferentes processos de produção da cerveja afetam na análise sensorial do produto final.

REFERÊNCIAS

- ALVES, V.; GONÇALVES, J.; FIGUEIRA, J. A.; ORNELAS, L. P.; BRANCO, R. N.; CÂMARA, J. S.; PEREIRA, J. A. M. Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. **Food Chemistry**, v. 326, 2019, p. 126856, 2020.
- AMBROSI, A.; CARDOZO, N. S. M.; TESSARO, I. C. Membrane Separation Processes for the Beer Industry: A Review and State of the Art. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 4, p. 921–936, 2014.
- ANDERSON, H. E.; LIDEN, T.; BERGER, B. K.; ZANELLA, D.; MANH, L. H.; WANG, S.; SCHUG, K. A. Profiling of contemporary beer styles using liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry, multivariate analysis, and machine learning techniques. **Analytica Chimica Acta**, v. 1172, p. 338668, 2021.
- ANTONIO, A. S.; AGUIAR A. T. C. A obtenção da amostra. Em: VEIGA JUNIOR, V. F.; WIEDEMANN, L. S. M.; MORAES, R. P. G. Práticas de laboratório de pesquisa em química de produtos naturais. Rio de Janeiro: Interciência, 2020.
- ATTCHELOUWA, C. K.; N'GUESSAN, F. K.; MARCOTTE, S.; AMOIKON, T. L. S.; CHARME, M.; DJÈ, M. K. Characterisation of volatile compounds associated to sensory changes during the storage of traditional sorghum beer by HS-GC/FID and SPME-GC/MS. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, 2020.
- BAMFORTH, C. W. Progress in brewing science and beer production. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 8, p. 161–176, 2017.
- BARTH, R. **The Chemistry of Beer: The Science in the Suds**. New Jersey: John Wiley and Sons Inc, 2016. v. 41–350 p.
- BARTHHAAS. **BarthHaas Report 2021/2022**. Disponível em: <<https://www.barthhaas.com/resources/barthhaas-report>>. Acesso em: 17 jan. 2023.
- BELLIDO-MILLA, D.; MORENO-PEREZ, J. M.; HERNÁNDEZ-ARTIGA, M. P. 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**, v. 55, n. 7, p. 855–864, 2000.
- BETTENHAUSEN, H. M.; BARR, L.; BROECKLING, C. D.; CHAPARRO, J. M.; HOLBROOK, C.; SEDIN, D.; HEUBERGER, A. L. Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. **Food Research International**, v. 113, n. July, p. 487–504, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.024>>.

BIANCOLILLO, A.; BUCCI, R.; MAGRÌ, A. L.; MAGRÌ, A. D.; MARINI, F. Data-fusion for multiplatform characterization of an italian craft beer aimed at its authentication.

Analytica Chimica Acta, v. 820, p. 23–31, 2014.

BLANCO, C. A.; ANDRÉS-IGLESIAS, C.; MONTERO, O. Low-alcohol Beers: Flavor Compounds, Defects, and Improvement Strategies. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 8, p. 1379–1388, 2016.

BRÁNYIK, T.; SILVA, D. P.; BASZCZYŃSKI, M.; LEHNERT, R.; ALMEIDA E SILVA, J. B. A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. **Journal of Food Engineering**, v. 108, n. 4, p. 493–506, 2012.

BRÁNYIK, T.; VICENTE, A. A.; DOSTÁLEK, P.; TEIXEIRA, J. A. A review of flavour formation in continuous beer fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 1, p. 3–13, 2008.

BRASIL, V. C. B.; GUIMARÃES, B. P.; EVARISTO, R. B. W.; CARMO, T. S.; GHESTI, G. F. Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* moench) characterization as adjunct in beer brewing. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 41, p. 265–272, 2021.

BUIATTI, S. Beer composition: An overview. *In*: **Beer in Health and Disease Prevention**. Elsevier Inc., 2008. p. 213–225.

CAPECE, A.; ROMANIELLO, R.; SIESTO, G.; ROMANO, P. Conventional and non-conventional yeasts in beer production **Fermentation**, v. 4, p. 38, 2018.

CELA, N.; CONDELLI, N.; CARUSO, M. C.; PERRETTI, G.; CAIRANO, M. Di; TOLVE, R.; GALGANO, F. Gluten-Free Brewing : Issues and Perspectives. **Fermentation**, v. 6, n. 53, p. 1–26, 2020.

CIÊNCIAS, I. D. E.; ICB, B.; MICROBIOLOGIA, P. D. E. P. E. M. Cerveja Micr. **Cerveja**, 2011.

COELHO, E.; MAGALHÃES, J.; PEREIRA, F. B.; MACIEIRA, F.; DOMINGUES, L.; OLIVEIRA, J. M. Volatile fingerprinting differentiates diverse-aged craft beers. **Lwt**, v. 108, n. March, p. 129–136, 2019.

DE SCHUTTER, D. P.; SAISON, D.; DELVAUX, F.; DERDELINCKX, G.; ROCK, J. M.; NEVEN, H.; DELVAUX, F. R. Optimisation of wort volatile analysis by headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1179, n. 2, p. 75–80, 2008.

DONG, L.; HOU, Y.; LI, F.; PIAO, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, X.; LI, C.; ZHAO, C.

Characterization of volatile aroma compounds in different brewing barley cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 5, p. 915–921, 2015.

DUCRUET, J.; RÉBÉNAQUE, P.; DISERENS, S.; KOSIŃSKA-CAGNAZZO, A.; HÉRITIER, I.; ANDLAUER, W. Amber ale beer enriched with goji berries – The effect on bioactive compound content and sensorial properties. **Food Chemistry**, v. 226, p. 109–118, 2017.

EMWAS, A.-H. M.; AL-TALLA, Z. A.; YANG, Y.; M., K. N. Gas Chromatography–Mass Spectrometry of Biofluids and Extracts. *In*: BJERRUM, J. T. **Metabonomics: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology**. Nova York: Springer Science Business Media, 2015.

FANARI, M.; FORTESCHI, M.; SANNA, M.; ZINELLU, M.; PORCU, M. C.; PRETTI, L. Comparison of enzymatic and precipitation treatments for gluten-free craft beers production. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 49, p. 76–81, 2018.

FRANCE, I.; AMERIEA, N. **Annual Hop Report for 1913/14**. Disponível em: <https://www.barthhaas.com/fileadmin/user_upload/01-barthhaas-2022/Downloads/Reports_Broschures/BarthHaas_Reports/English/1910-1920/barth-report-1913-1914.pdf>.

GONZALEZ VIEJO, C.; FUENTES, S.; TORRICO, D.; HOWELL, K.; DUNSHEA, F. R. Assessment of beer quality based on foamability and chemical composition using computer vision algorithms, near infrared spectroscopy and machine learning algorithms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 2, p. 618–627, 2018.

HAGER, A. S.; TAYLOR, J. P.; WATERS, D. M.; ARENDT, E. K. Gluten free beer - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 36, p. 44-54, 2014.

HO, C. T.; ZHENG, X.; LI, S. Tea aroma formation. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 1, p. 9–27, 2015.

HOLT, S.; MIKS, M. H.; DE CARVALHO, B. T.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 43, n. 3, p. 193–222, 2019.

HORÁCIO, P. S.; VEIGA, B. A.; LUZ, L. F.; LEVEK, C. A.; DE SOUZA, A. R.; SCHEER, A. P. Simulation of vacuum distillation to produce alcohol-free beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 126, n. 1, p. 77–82, 2020.

IGNAT, M. V.; SALANȚĂ, L. C.; POP, O. L.; POP, C. R.; TOFANĂ, M.; MUDURA, E.; COLDEA, T. E.; BORȘA, A.; PASQUALONE, A. Current functionality and potential improvements of non-alcoholic fermented cereal beverages. **Foods**, v. 9, p. 1031, 2020.

JIAO, J.; DING, N.; SHI, T.; CHAI, X.; CONG, P.; ZHU, Z. Study of chromatographic fingerprint of the flavor in beer by HS-SPME-GC. **Analytical Letters**, v. 44, n. 4, p. 648–655, 2011.

KERPES, R.; FISCHER, S.; BECKER, T. The production of gluten-free beer: Degradation of hordeins during malting and brewing and the application of modern process technology focusing on endogenous malt peptidases. **Trends in Food Science and Technology**, v. 67, p. 129–138, 2017.

KUBALLA, T.; BRUNNER, T. S.; THONGPANCHANG, T.; WALCH, S. G.; LACHENMEIER, D. W. Application of NMR for authentication of honey, beer and spices. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 57–62, 2018.

LEITAO, C.; MARCHIONI, E.; BERGAENTZLÉ, M.; ZHAO, M.; DIDIERJEAN, L.; TAIDI, B.; ENNAHAR, S. Effects of processing steps on the phenolic content and antioxidant activity of beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 4, p. 1249–1255, 2011.

LIU, S.; LAAKSONEN, O.; MARSOL-VALL, A.; ZHU, B.; YANG, B. Comparison of Volatile Composition between Alcoholic Bilberry Beverages Fermented with Non-Saccharomyces Yeasts and Dynamic Changes in Volatile Compounds during Fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 11, p. 3626–3637, 2020.

MAYER, H.; CECCARONI, D.; MARCONI, O.; SILEONI, V.; PERRETTI, G.; FANTOZZI, P. Development of an all rice malt beer: A gluten free alternative. **Lwt**, v. 67, p. 67–73, 2016.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009** Brasil. 2009. Disponível em: <https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm>.

MITRI, S.; SALAMEH, S. J.; KHELFA, A.; LEONARD, E.; MAROUN, R. G.; LOUKA, N.; KOUBAA, M. Valorization of Brewers' Spent Grains: Pretreatments and Fermentation, a Review. **Fermentation**, v. 8, n. 2, 2022.

MONGELLI, A.; RODOLFI, M.; GANINO, T.; MARIESCHI, M.; DALL'ASTA, C.; BRUNI, R. Italian hop germplasm: Characterization of wild *Humulus lupulus* L. genotypes from

Northern Italy by means of phytochemical, morphological traits and multivariate data analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 16–27, 2015.

MORADO, R. **Iorousse da Cerveja**. São Paulo: Alaúde Editorial Ltda, v. 4, p. 488–100, 2009..

MULLER, C.; NEVES, L. E.; GOMES, L.; GUIMARÃES, M.; GHESTI, G. Processes for alcohol-free beer production: A review. **Food Science and Technology**, v. 40, p. 273–281, 2020.

NOVAES, C. G.; YAMAKI, R. T.; DE PAULA, V. F.; DO NASCIMENTO JÚNIOR, B. B.; BARRETO, J. A.; VALASQUES, G. S.; BEZERRA, M. A. Optimization of analytical methods using response surface methodology part i: Process variables. **Revista Virtual de Quimica**, v. 9, p. 1184–1215, 1 maio 2017.

OETTERER, M.; R, A. A. Tecnologia da fabricação da cerveja. *In*: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. p. 51–98.

OLANIRAN, A. O.; HIRALAL, L.; MOKOENA, M. P.; PILLAY, B. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, p. 13–23, 2017.

OLMO, Á. Del; BLANCO, C. A.; PALACIO, L.; PRÁDANOS, P.; HERNÁNDEZ, A. Pervaporation methodology for improving alcohol-free beer quality through aroma recovery. **Journal of Food Engineering**, v. 133, p. 1–8, 2014.

QUIFER-RADA, P.; VALLVERDÚ-QUERALT, A.; MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; CHIVA-BLANCH, G.; JÁUREGUI, O.; ESTRUCH, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Food Chemistry**, v. 169, p. 336–343, 2015.

RETTBERG, N.; LAFONTAINE, S.; SCHUBERT, C.; DENNENLÖHR, J.; KNOKE, L.; FISCHER, P. D.; FUCHS, J.; THÖRNER, S. Effect of Production Technique on Pilsner-Style Non-Alcoholic Beer (NAB) Chemistry and Flavor. **Beverages**, v. 8, p. 4, 2022.

RIU-AUMATELL, M.; MIRÓ, P.; SERRA-CAYUELA, A.; BUXADERAS, S.; LÓPEZ-TAMAMES, E. Assessment of the aroma profiles of low-alcohol beers using HS-SPME-GC-MS. **Food Research International**, v. 57, p. 196–202, 2014.

RODRIGUEZ-BENCOMO, J. J.; MUÑOZ-GONZÁLEZ, C.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; LÁZARO, E.; MANCEBO, R.; CASTAÑÉ, X.; POZO-BAYÓN, M. A. Optimization of a HS-SPME-GC-MS Procedure for Beer Volatile Profiling Using Response Surface

Methodology: Application to Follow Aroma Stability of Beers Under Different Storage Conditions. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 1386–1397, 2012.

ROMANO, P.; FIORE, C.; PARAGGIO, M.; CARUSO, M.; CAPECE, A. Function of yeast species and strains in wine flavour. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 169–180, 2003.

ROSA, N. A.; JÚLIO CARLOS AFONSO. A Química da Cerveja. **Química nova na escola**, v. 37, p. 98–105, 2014.

RUBIO-FLORES, M.; SERNA-SALDIVAR, S. O. Technological and Engineering Trends for Production of Gluten-Free Beers. **Food Engineering Reviews**, v. 8, p. 468–482, 2016.

S.HORNSEY, I. **A HISTORY OF BEER AND BREWING**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2003.

SALANȚĂ, L. C.; COLDEA, T. E.; IGNAT, M. V.; POP, C. R.; TOFANĂ, M.; MUDURA, E.; BORȘA, A.; PASQUALONE, A.; ZHAO, H. Non-alcoholic and craft beer production and challenges. **Processes**, v. 8, p. 1–22, 2020.

SANTOS, S. de P. **Os primórdios da cerveja no Brasil**. Cotia: Ateliê editorial, 2004. 56 p.

SCHIEBERLE, P. Primary odorants of pale lager beer - Differences to other beers and changes during storage. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung**, v. 193, p. 558–565, 1991.

SENKARCINOVA, B.; GRAÇA DIAS, I. A.; NESPOR, J.; BRANYIK, T. Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Lwt**, v. 100, n. October 2018, p. 362–367, 2019.

SEO, S. H.; KIM, E. J.; PARK, S. E.; PARK, D. H.; PARK, K. M.; NA, C. S.; SON, H. S. GC/MS-based metabolomics study to investigate differential metabolites between ale and lager beers. **Food Bioscience**, v. 36, p. 100671, 2020.

SHARP, M. E. E. A comprehensive screen for volatile organic compounds in biological fluids. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 25, p. 631–636, 2001.

SILVELLO, G. C. Qualidade química e perfil sensorial da cerveja envelhecida em barris de diferentes madeiras. p. 96, 2019.

SOHRABVANDI, S.; MOUSAVI, S. M.; RAZAVI, S. H.; MORTAZAVIAN, A. M.; REZAEI, K. Alcohol-free beer: Methods of production, sensorial defects, and healthful effects.

Food Reviews International, v. 26, p. 335–352, 2010.

TAN, J.; LI, R.; JIANG, Z. T. Chemometric classification of Chinese lager beers according to manufacturer based on data fusion of fluorescence, UV and visible spectroscopies.

Food Chemistry, v. 184, p. 30–36, 2015.

VALENTIN, D.; CHOLLET, S.; BEAL, S.; PATRIS, B. Expertise and memory for beers and beer olfactory compounds. **Food Quality and Preference**, v. 18, p. 776–785, 2007.

VAN BOEKEL, M. A. J. S. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction.

Biotechnology Advances, v. 24, p. 230–233, 2006.

VANDERHAESEN, B.; DELVAUX, F.; DAENEN, L.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F. R. Aging characteristics of different beer types. **Food Chemistry**, v. 103, p. 404–412, 2007.

VANDERHAESEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging - A critical review. **Food Chemistry**, v. 95, p. 357–381, 2006.

VERA, L.; ACEÑA, L.; GUASCH, J.; BOQUÉ, R.; MESTRES, M.; BUSTO, O. Discrimination and sensory description of beers through data fusion. **Talanta**, v. 87, p. 136–142, 2011.

VIVIAN, A. F.; AOYAGUI, C. T.; DE OLIVEIRA, D. N.; CATHARINO, R. R. Mass spectrometry for the characterization of brewing process. **Food Research International**, v. 89, p. 281–288, 2016.

WANG, Z.; JIANG, M.; GUO, X.; LIU, Z.; HE, X. Reconstruction of metabolic module with improved promoter strength increases the productivity of 2-phenylethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 17, p. 1–14, 2018.

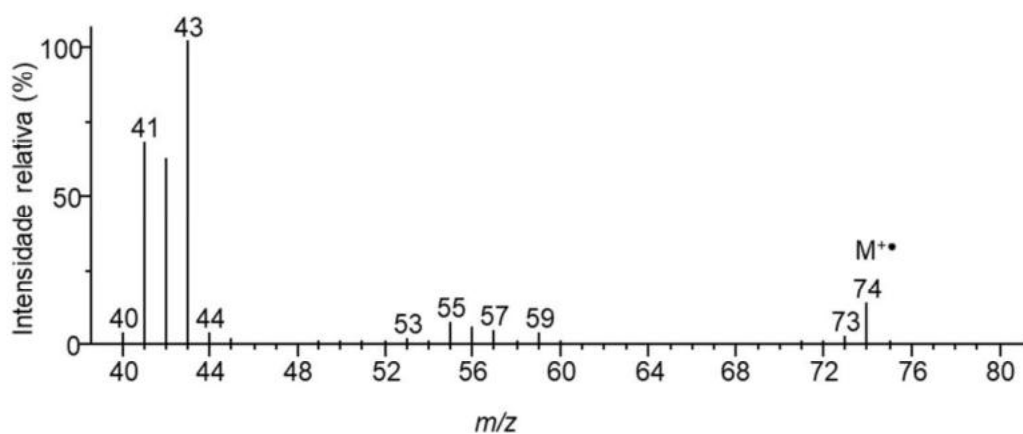
WHO. **Alcohol**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/alcohol#tab=tab_1>. Acesso em: 19 jan. 2023.

YANG, Q.; TU, J.; CHEN, M.; GONG, X. Discrimination of Fruit Beer Based on Fingerprints by Static Headspace-Gas Chromatography-Ion Mobility Spectrometry. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 80, p. 298–304, 2022.

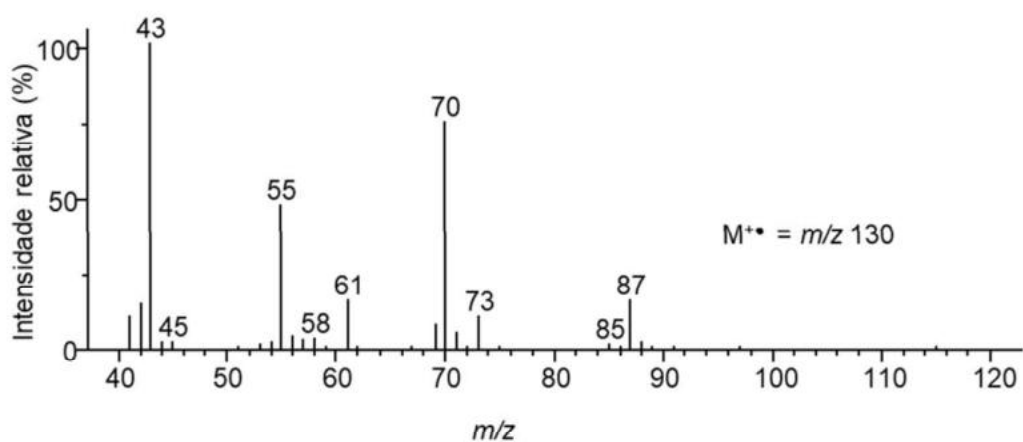
APÊNDICE I

Espectro de massas dos principais analitos identificados em amostras de cervejas utilizando a técnica de CG-EM.

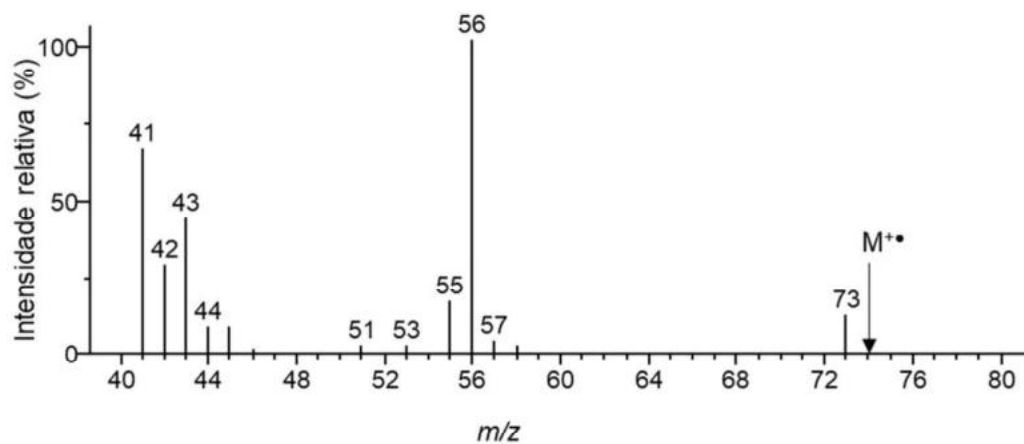
- **2-metilpropano-1-ol**



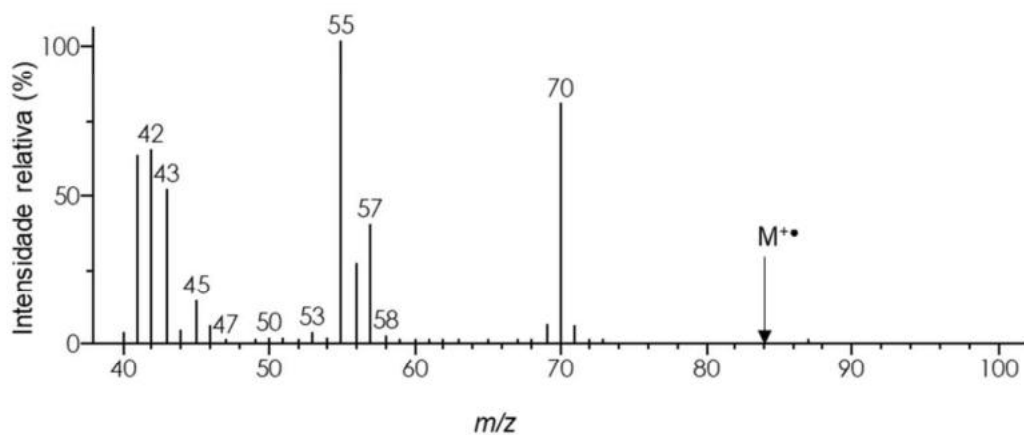
- **Etanoato de isopentila**



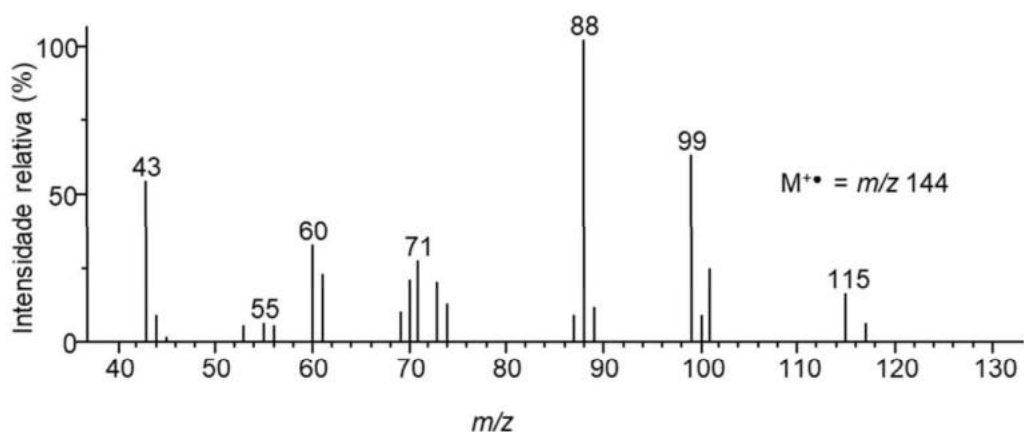
- Butan-1-ol



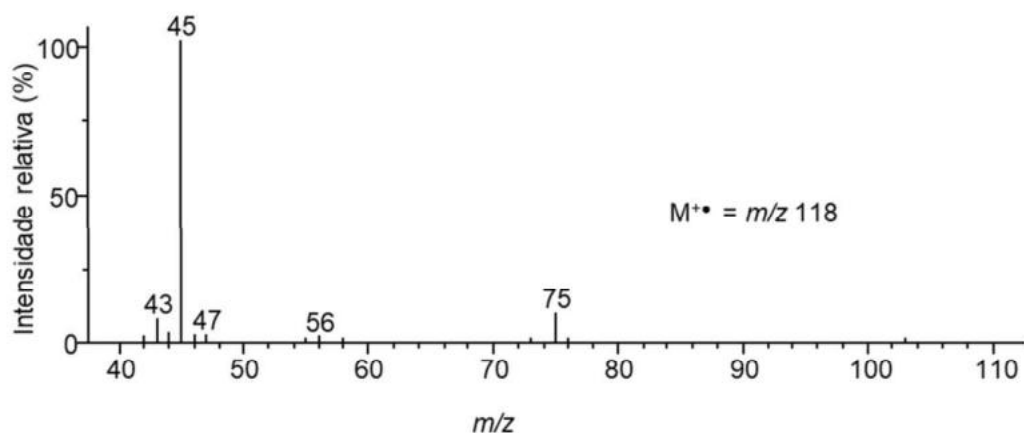
- 3-metilbutan-1-ol



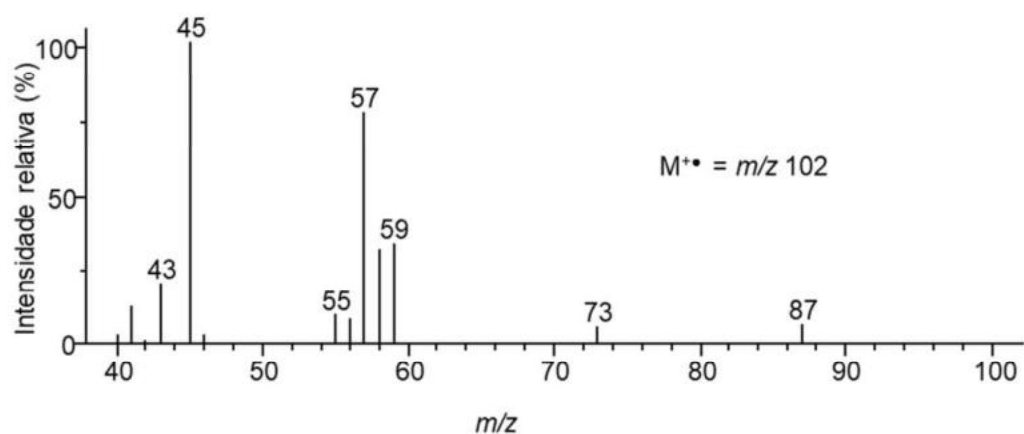
- Hexanoato de etila



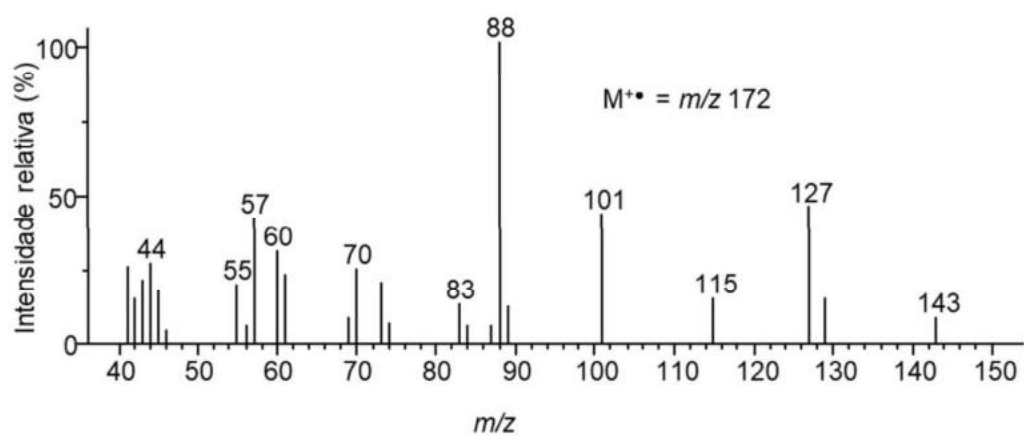
- 2-hidroxiopropanoato de etila



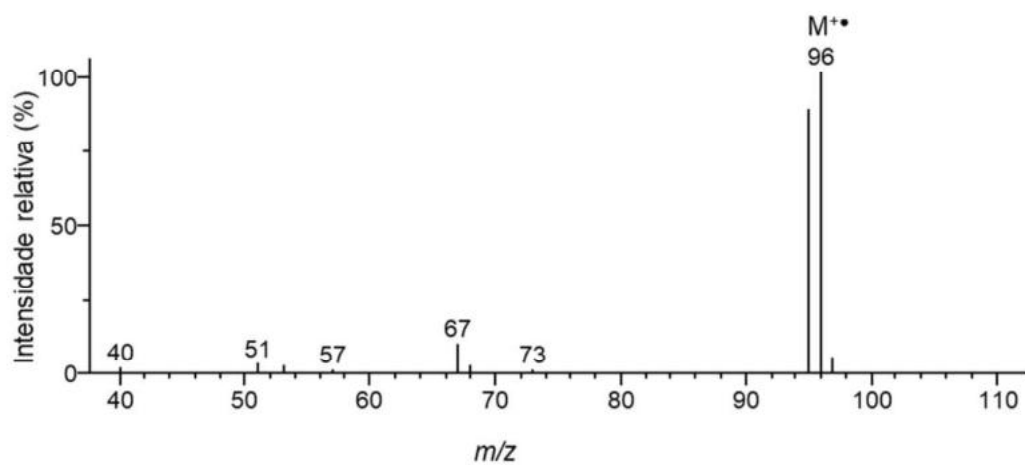
- 2-hidroxiopropanoato de etila



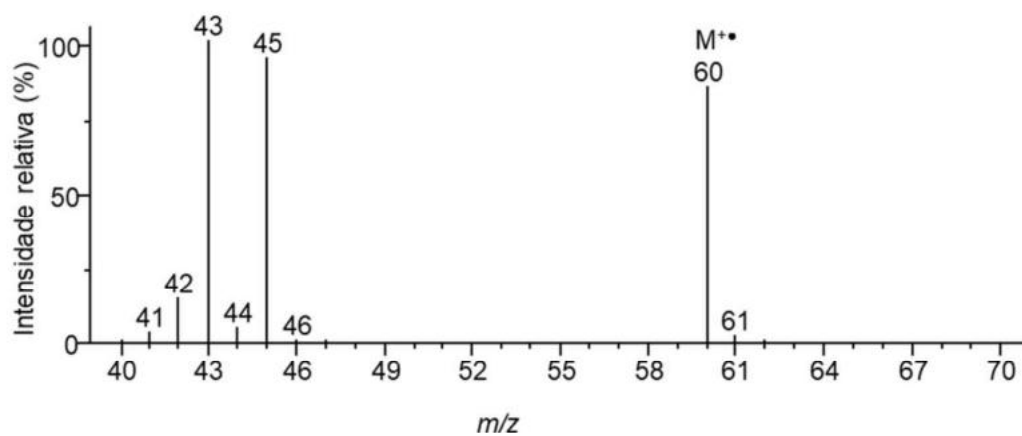
- Octanoato de etila



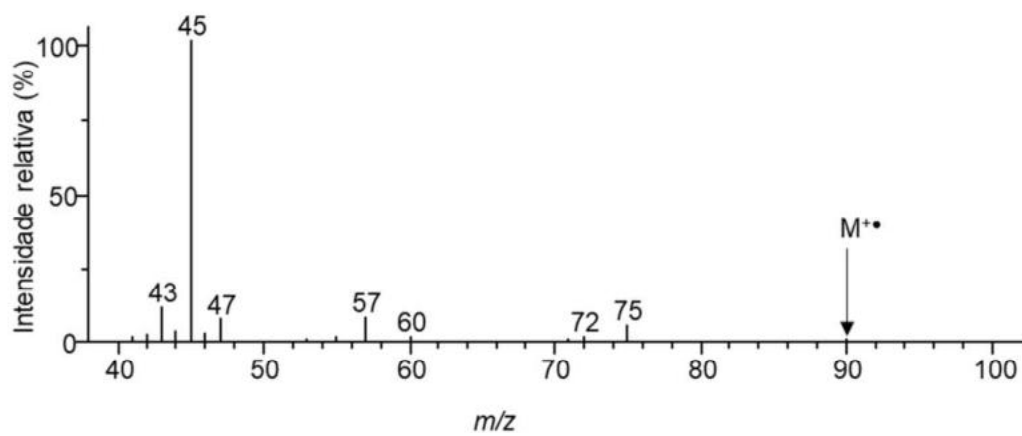
- Furan-2-carbaldeído



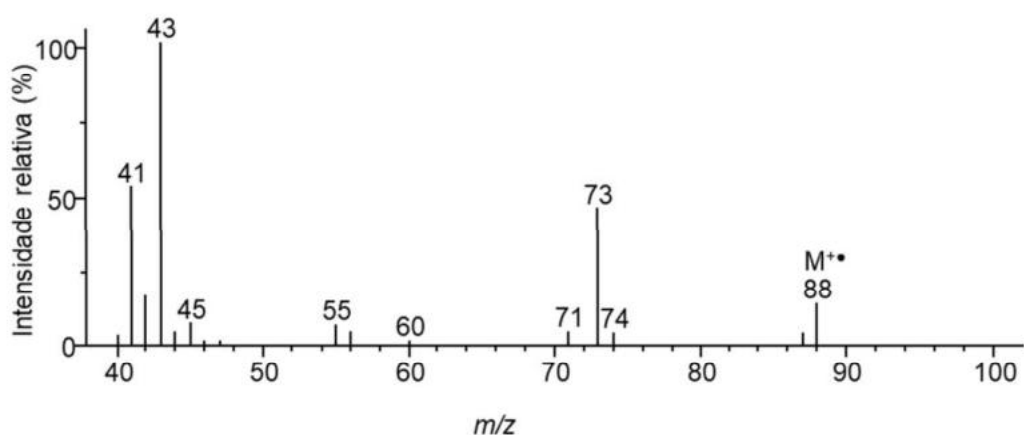
- Ácido acético



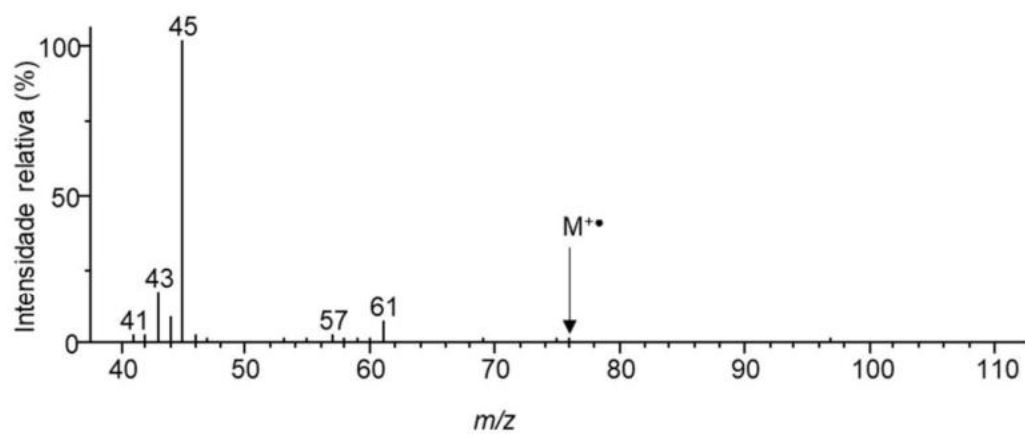
- Butan-2,3-diol



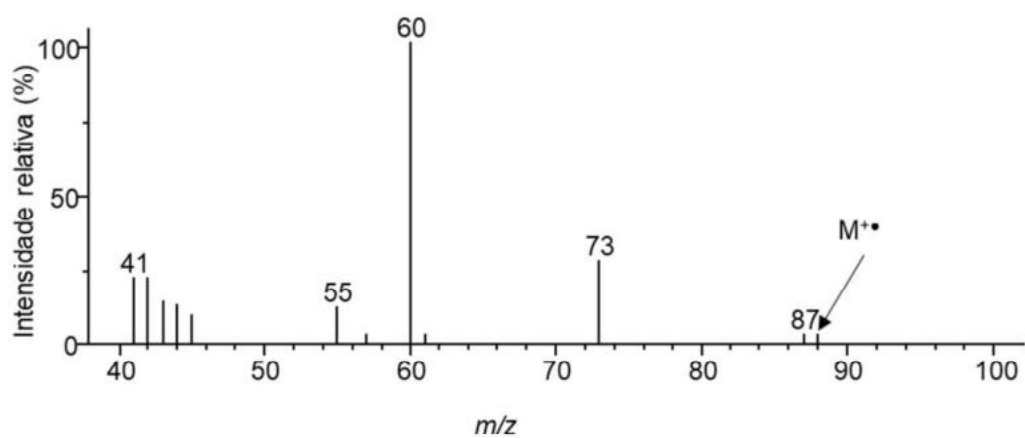
- **Ácido 2-metilpropanoico**



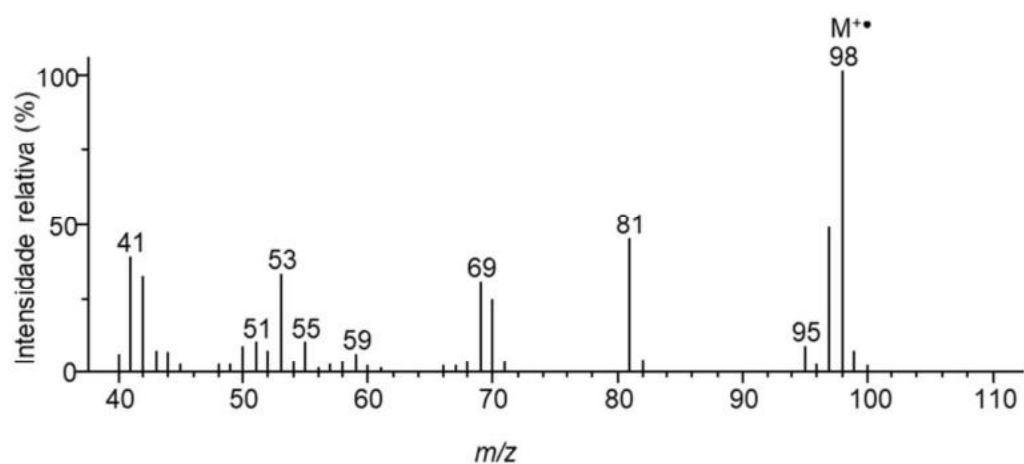
- **Propan-1,2-diol**



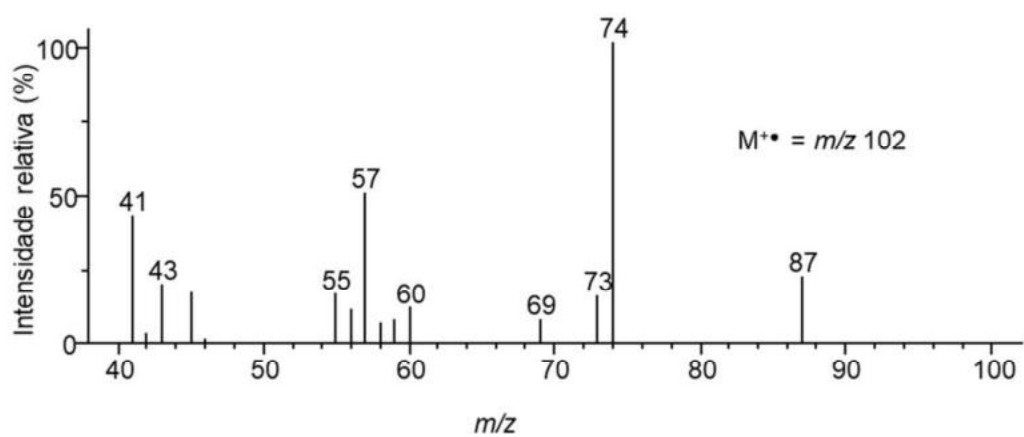
- **Ácido butanoico**



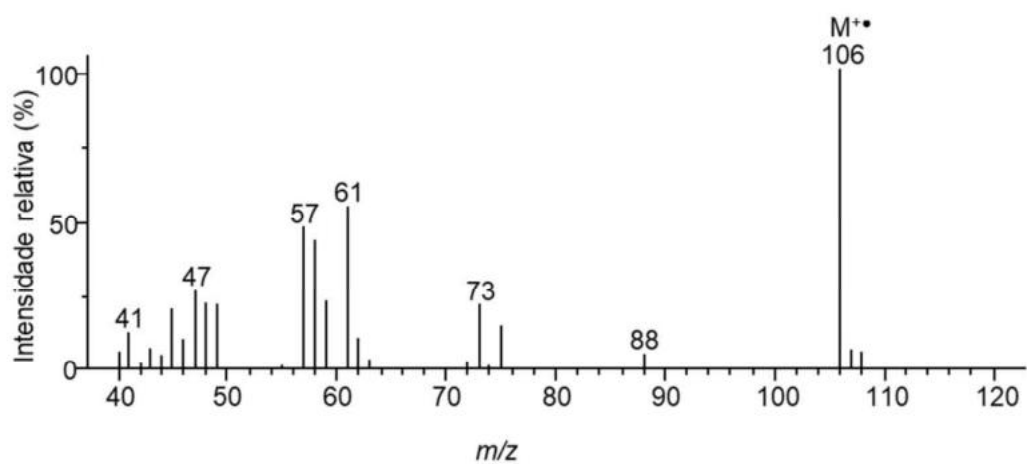
- Furan-2-ilmetanol



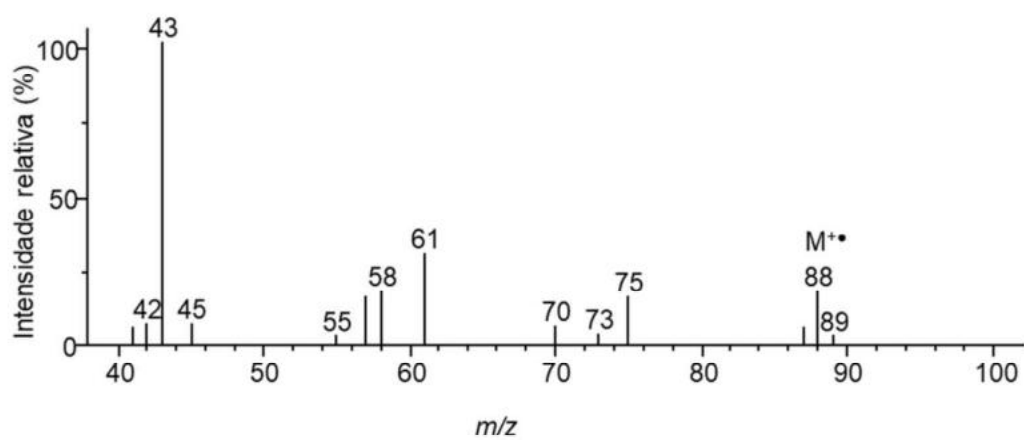
- Ácido 2-metilbutanoico



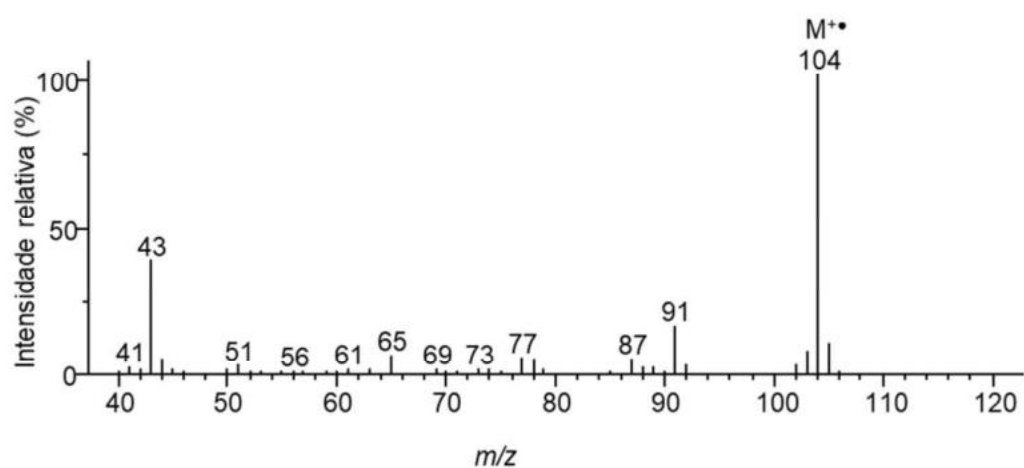
- 3-metilsulfanilpropan-1-ol



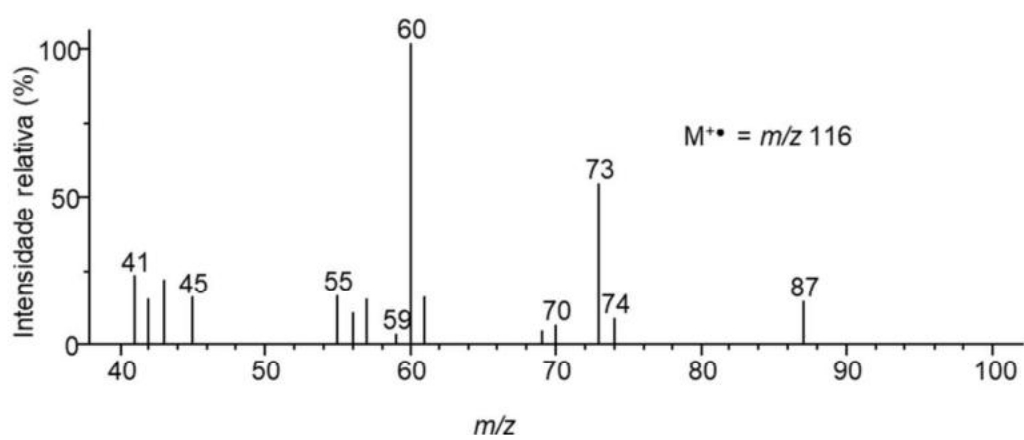
- 4-hidroxibutan-2-ona



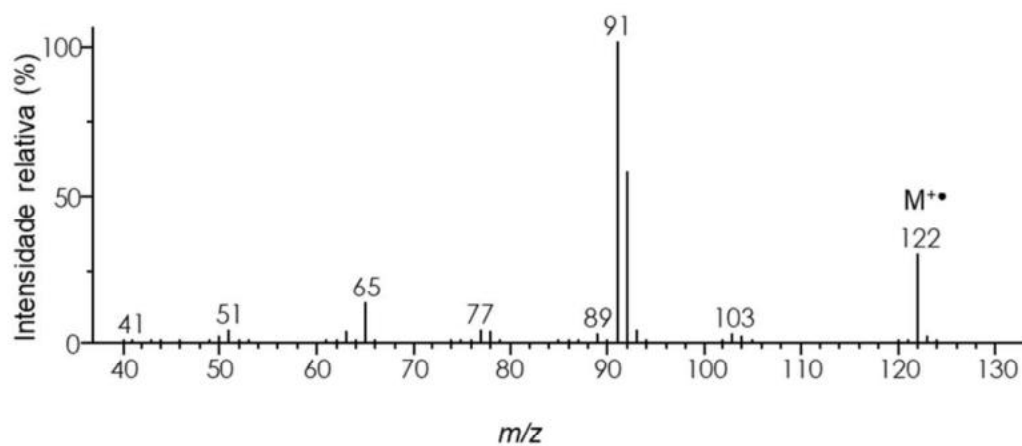
- Acetato de 2-feniletila



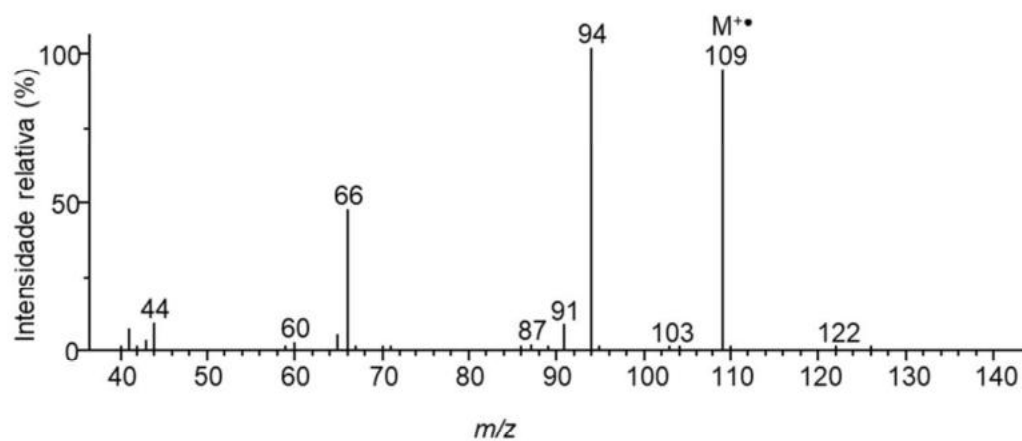
- Ácido hexanoico



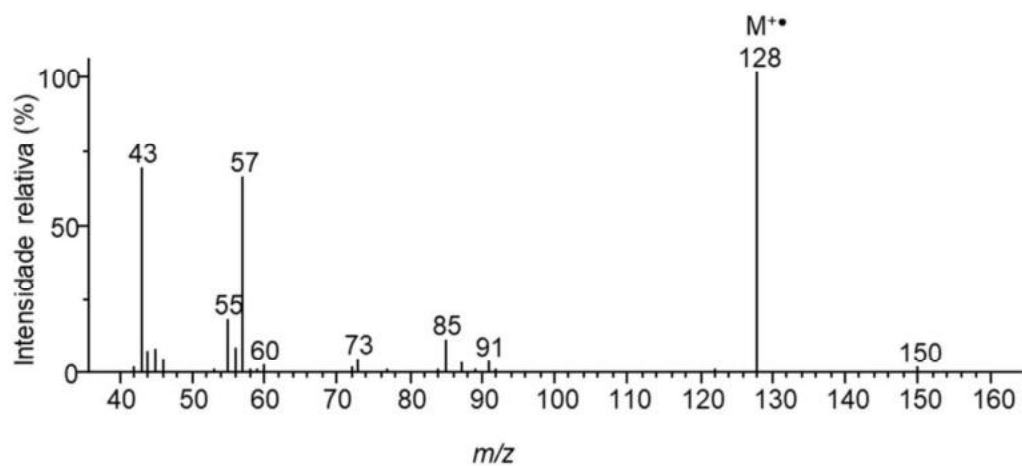
- 2-feniletanol



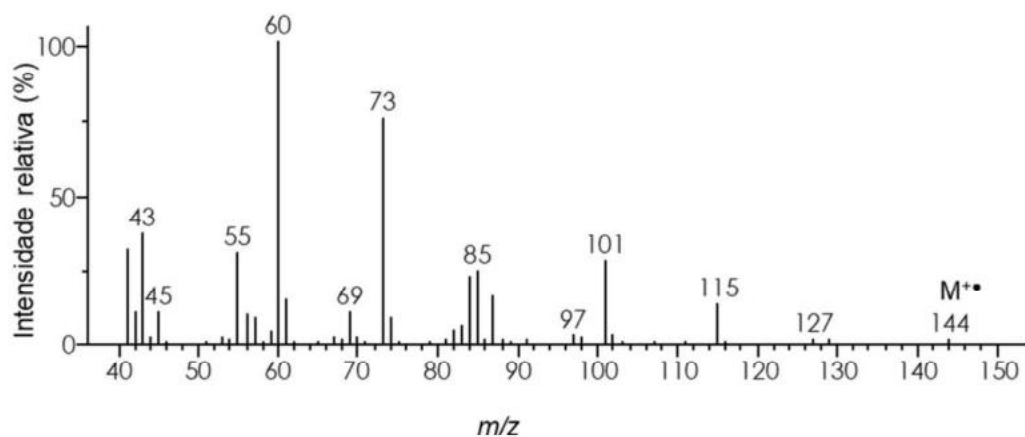
- 1-(1H-pirrol-2-il)-etanona



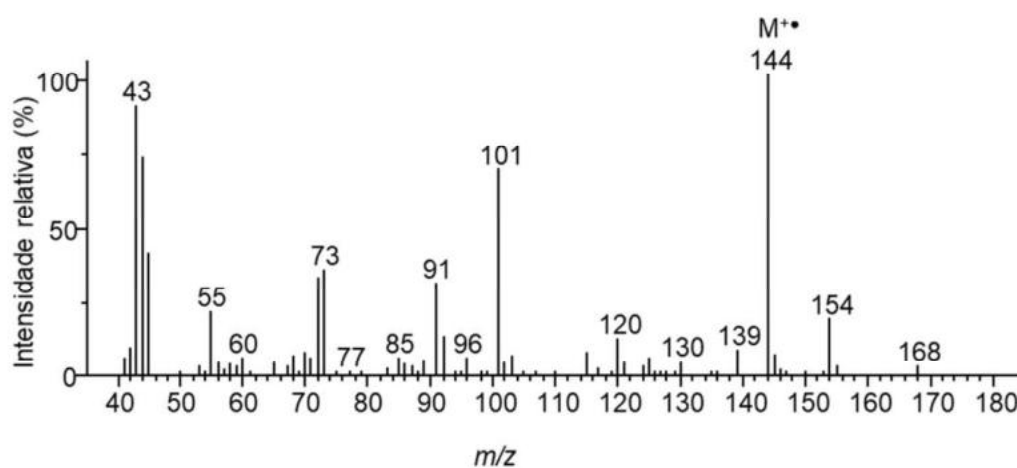
- 4-Hidroxi-2,5-dimetilfuran-3-ona



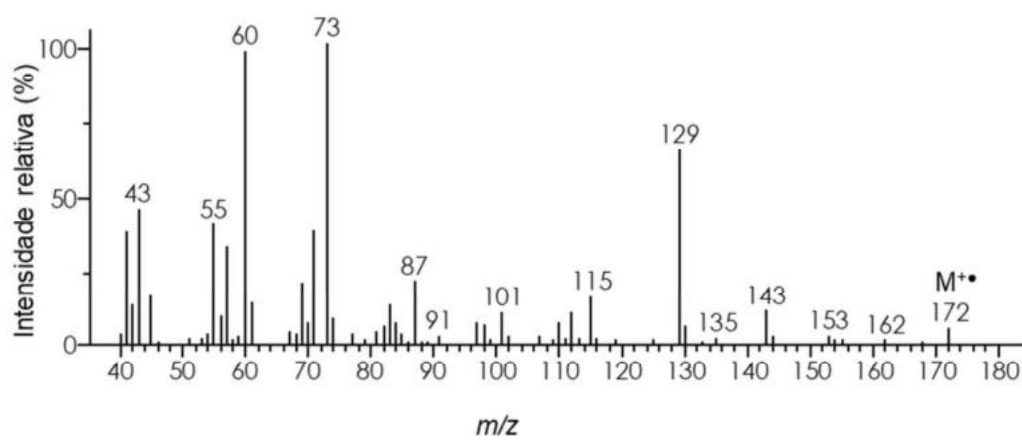
- **Ácido octanoico**



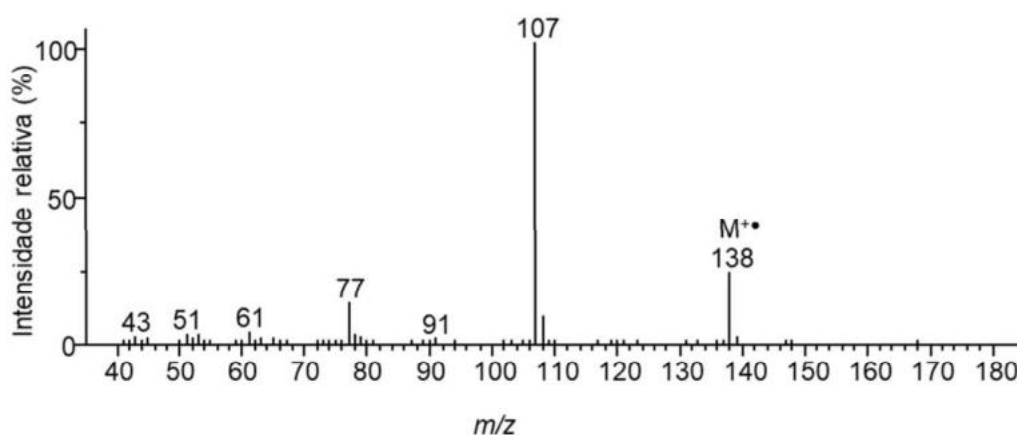
- **2,3-dihidro-3,5-dihidroxi--6-metil-4H-piran-4-ona**



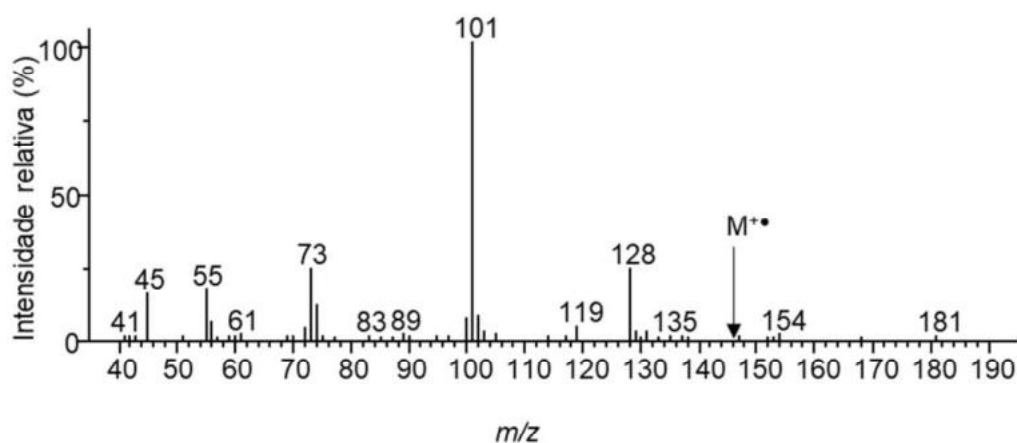
- **Ácido decanoico**



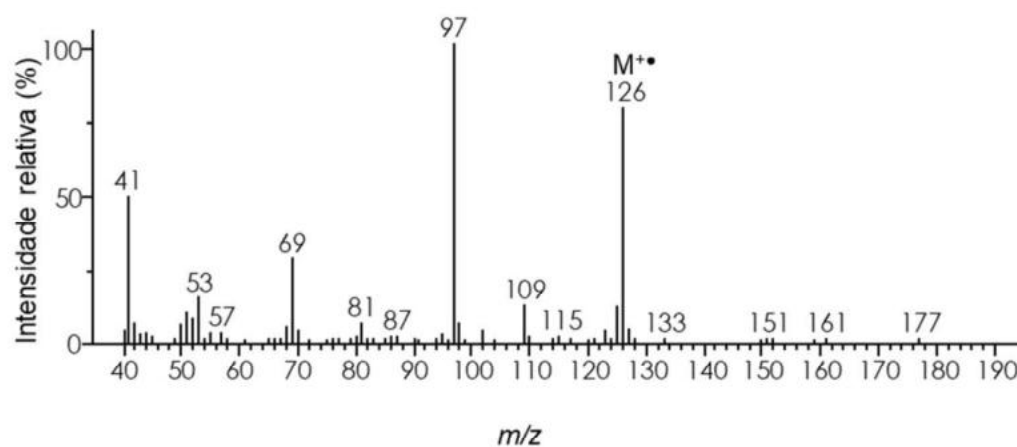
- 4-Hidroxifeniletil álcool



- Ácido 4-etoxi-4-oxobutanoico



- 5-(hidroximetil)furan-2-carbaldeído



APÊNDICE II

Trabalhos apresentados em congressos

DAL SASSO, M. A.; ANTONIO, A. S.; COSTA, G. V. Otimização de método de extração do produto cervejeiro por ferramentas de Delineamento Experimental (DoE). Em: XVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, 2022, Rio de Janeiro Brasil.

DAL SASSO, M. A.; ANTONIO, A. S.; COSTA, G. V. Comparação do perfil químico de produtos cervejeiros alcoólicos e não alcoólicos por análise multivariada. Em: I Encontro Anual do Pós- Graduação em Química - UFRJ, 2022, Rio de Janeiro, Brasil.