

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Stephanie Vertelo Porto

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO PERFIL DE VOLÁTEIS EM CERVEJAS PILSEN
ARTESANAIS E INDUSTRIAIS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA A GÁS POR
IONIZAÇÃO EM CHAMA E ESPECTRÔMETRO DE MASSAS**

Belo Horizonte
2023

UFMG/ICEX/DQ.1577

D. 855

Stephanie Vertelo Porto

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO PERFIL DE VOLÁTEIS EM CERVEJAS PILSEN
ARTESANAIS E INDUSTRIAIS UTILIZANDO CROMATOGRAFIA A GÁS POR
IONIZAÇÃO EM CHAMA E ESPECTRÔMETRO DE MASSAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Analítica.

Orientador: Ricardo Mathias Orlando

Coorientador: Bruno Gonçalves Botelho

Belo Horizonte

2023

Ficha Catalográfica

P853a Porto, Stephanie Vertelo.
2023 Análise exploratória do perfil de voláteis em cervejas Pilsen artesanais e industriais
D utilizando cromatografia a gás por ionização em chama e espectrômetro de massas
[manuscrito] / Stephanie Vertelo Porto. 2023.
108 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Ricardo Mathias Orlando.
Coorientador: Bruno Gonçalves Botelho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de Química.

Bibliografia: f. 96-104.
Apêndices: f. 105-108.

1. Química analítica – Teses. 2. Compostos orgânicos voláteis – Teses. 3. Cromatografia de gás – Teses. 4. Espectrometria de massa – Teses. 5. Fermentação – Teses. 6. Cerveja – Indústria – Teses. 7. Análise de componentes principais – Teses. 8. Cerveja – Teses. 9. Hidrocarbonetos – Teses. 10. Extração (Química) – Teses. 11. Preparação de amostra (Química) – Teses. I. Orlando, Ricardo Mathias, Orientador. II. Botelho, Bruno Gonçalves, Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



“Análise Exploratória do Perfil de Voláteis em Cervejas Pilsen Artesanais e Industriais Utilizando Cromatografia a Gás por Ionização em Chama e Espectrômetro de Massas”

Stephanie Vertelo Porto

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Ricardo Mathias Orlando - Orientador
UFMG

Prof. Bruno Gonçalves Botelho - Coorientador
UFMG

Profa. Adriana Nori de Macedo
UFMG

Dra. Amanda Lemes Silveira Carvalho

Belo Horizonte, 16 de novembro de 2023



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior**, em 16/11/2023, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Amanda Lemes Silveira Carvalho, Usuária Externa**, em 16/11/2023, às 17:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Mathias Orlando, Professor do Magistério Superior**, em 17/11/2023, às 06:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Goncalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 20/11/2023, às 09:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2803973** e o código CRC **F1A9CB70**.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ção e Tonho, pelos seus incansáveis esforços para me proporcionar oportunidades que nunca puderam ter.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a UFMG e ao programa de pós-graduação em química pela infraestrutura e pela possibilidade de aprender com a rica experiência de professores, professoras e colegas. A CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro por meio da bolsa PROEX.

À minha mãe, pelo contínuo e presente apoio incondicional, sentimental, físico, psicológico e por sempre estar ao meu lado. Ao meu pai e ao meu irmão pelo apoio e torcida. Ao meu namorado pela presença, cuidado e carinho nessa etapa tão desafiadora.

Ao professor Dr. Ricardo Mathias Orlando pelo cuidado das correções atentas, pelo acompanhamento e por me incentivar a pensar de forma analítica, planejada e organizada.

Ao professor Dr. Bruno Gonçalves Botelho por me apresentar ao universo das cervejas e por auxiliar durante os desafios no uso dos cromatógrafos.

Aos prezados membros da banca, professora Adriana Nori e Amanda Lemes, pela dedicação, tempo cedido e pelas recomendações pertinentes e enriquecedoras para este trabalho.

A todas as amigas do LAMS, que fizeram parte dos dias leves e tensos presencialmente no laboratório. Um agradecimento imenso ao Glaucimar, o querido amigo Jimmy, por me apresentar aos laboratórios do DQ, me ensinar sobre o uso do HS-SPME, me enviar inúmeros artigos que me auxiliaram na compreensão do trabalho e por revisar minha dissertação. Nossas caminhadas, mensagens e reuniões online não serão esquecidas.

A Gabi, amiga que me acompanha desde a graduação, pelo apoio contínuo. Agradeço o convite de atuar como estagiária voluntária do sistema de gestão da qualidade do CRA. Agradeço a professora Claudia Carvalhinho por ter aprovado minha participação e ao professor Ricardo. Agradeço também à Tarci por ter sido uma gestora muito querida.

Ao professor James Harynuk pela enorme consideração em me ajudar quando tentei o estágio no Canadá. À Universidade de Alberta e ao grupo TMIC por abrirem as portas para mim. Ao programa UARE pelo auxílio financeiro, que foi fundamental para a minha estadia. Agradeço ao Ryan pelo método cromatográfico inicial e ao Kieran por me auxiliar nas próximas etapas do tratamento de dados das amostras de cerveja.

Por último, mas não menos importante, agradeço a mim por ter seguido firme nos piores e melhores momentos dessa jornada. Por fazer um trabalho responsável, com muita dedicação, e por sempre tentar todas as oportunidades, por mais sonhadoras e impossíveis que pareçam. Pelas diversas noites em claro estudando, pela persistência do início ao fim e por acreditar que a educação é libertadora e vale a pena.

RESUMO

PORTO, S. V. Análise exploratória do perfil de voláteis em cervejas Pilsen artesanais e industriais utilizando cromatografia a gás por ionização em chama e espectrômetro de massas.

A qualidade da cerveja está associada a seu aspecto sensorial, como o sabor e o aroma. Essas características são influenciadas pelos compostos voláteis produzidos durante a fabricação da cerveja, sintetizados principalmente pelas leveduras. Este trabalho teve por objetivo realizar a análise exploratória de cervejas Pilsen industriais e artesanais por meio da técnica de microextração em fase sólida em modo *headspace* (HS-SPME), utilizando uma fibra de poliacrilato (PA), com posterior análise por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS). Inicialmente o planejamento experimental Box-Behnken (BBD) e a metodologia de superfície de resposta foram utilizados para avaliar os parâmetros da extração em relação aos sinais obtidos para três classes de analitos, sendo eles álcoois (superiores e monoterpênicos), ésteres e ácidos carboxílicos. As condições ótimas foram tempo de extração de 40 min, temperatura de extração de 40 °C e volume de amostra de 4 mL. Um total de 22 amostras, sendo 11 industriais e 11 artesanais, foram analisadas pelo método proposto, em duplicata. A análise dos resultados foi realizada utilizando métodos multivariados, como a análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de agrupamentos (HCA). As análises possibilitaram agrupar as amostras e averiguar as diferenças e semelhanças entre as cervejas artesanais e industriais perante as classes de analitos avaliados.

Palavras-chave: GC-MS, Cerveja Pilsen, HS-SPME, Compostos Voláteis.

ABSTRACT

PORTO, S. V. Exploratory analysis of the volatile profile in craft and industrial Pilsner beer using gas chromatography coupled with flame ionization and mass spectrometer.

The quality of beer is usually associated with its sensorial aspects, such as flavor and aroma. These characteristics are influenced by the volatile compounds produced during the beer production process and are mainly synthesized by yeast. This work aimed to carry out an exploratory analysis of industrial and craft Pilsner beers using the headspace solid-phase microextraction technique (HS-SPME) with a polyacrylate fiber (PA) with subsequent analysis by gas chromatography coupled to a mass spectrometer (GC-MS). Initially, a Box-Behnken experimental design (BBD) and response surface methodology were used to evaluate the extraction parameters regarding the signals obtained for three classes of analytes, namely alcohols (higher and monoterpene), esters, and carboxylic acids. The optimal conditions were an extraction time of 40 min, an extraction temperature of 40 °C, and a sample volume of 4 mL. A total of 22 samples, 11 industrial beers and 11 craft beers, were analyzed using the proposed method, in duplicate. The analysis of results was performed using multivariate methods, such as principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA). The clusters obtained made it possible to group the samples and investigate the differences and similarities between craft and industrial beers concerning the analytes evaluated.

Keywords: GC-MS, Pilsner beer, HS-SPME, Volatile Compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Alguns dos diferentes estilos de cervejas Lager.	23
Figura 2 – Etapas do processo produtivo da cerveja, incluindo alguns dos principais componentes adicionados.	24
Figura 3 – Processo bioquímico de fermentação alcoólica por meio da glicólise.	27
Figura 4 – Vias biossintéticas de formação de voláteis durante a fermentação. As setas tracejadas indicam processos que ocorrem permeando (entrando ou saindo) a membrana da levedura. As cores estão relacionadas com o tipo de processo envolvido, como a redução de açúcares (verde), a produção de álcoois e ésteres (lilás), processos que ocorrem durante a maturação da cerveja (rosa) e produção de fenóis (laranjado) a partir dos ácidos hidroxâmicos (HCAs).	28
Figura 5 – Total de estabelecimentos registrados por Estados no Brasil em 2022.	31
Figura 6 – Porcentagem de artigos científicos que contemplam diferentes técnicas analíticas para análise de voláteis em cervejas.	33
Figura 7 – Processo de microextração em fase sólida nas etapas a) extração dos analitos contidos na amostra e b) dessorção dos analitos no injetor do cromatógrafo a gás. Os números indicam 1) seringa do <i>holder</i> perfurando o septo do <i>vial</i> , 2) o <i>vial</i> contendo a amostra e os analitos, 3) a fibra exposta em modo <i>headspace</i> , 4) a fibra exposta em modo imersão direta, 5) o <i>holder</i> retirado do sistema com a fibra retraída dentro da seringa, 6) o injetor do cromatógrafo e 7) o <i>liner</i>	38
Figura 8 – Mecanismos de extração para materiais utilizados como revestimentos de fibra SPME.	39
Figura 9 – Três fases do sistema HS-SPME que contemplam a solução, a fibra e o <i>headspace</i>	42
Figura 10 – Representação gráfica a) dos experimentos <i>Box-Behnken</i> ao longo do cubo e b) da superfície de resposta gerada com uma região (em vermelho) de respostas mais altas.	46
Figura 11 – Imagens da extração por HS-SPME com a) o aparato montado e b) durante a dessorção dos analitos. Os números indicam 1) termômetro, 2) <i>holder</i> de SPME, 3) <i>vial</i> contendo a amostra, 4) bloco de aquecimento envolto por membrana de cortiça, 5) agitador magnético com aquecimento e 6) injetor do GC-MS	54
Figura 12 – Inserção da amostra de cerveja, com o auxílio de uma seringa (1) no densímetro digital (2) para medição do extrato aparente.	57

Figura 13 – Cromatogramas de íons totais dos testes realizados para a otimização da separação cromatográfica.	59
Figura 14 – Cromatogramas de íons totais dos pontos de saturação do detector observados ao longo da corrida cromatográfica para os analitos 1) álcool β -fenetílico, 2) ácido octanoico e 3) ftalato de dietila.	60
Figura 15 – Cromatograma da amostra ART-C utilizando método otimizado M3 com identificação dos analitos 1) n-butanol (padrão interno), 2) álcool isoamílico, 3) octanoato de etila, 4) linalol, 5) decanoato de etila, 6) acetato de 2-fenetila, 7) ácido hexanoico, 8) álcool β -fenetílico, 9) ácido octanoico e 10) ácido decanoico.....	61
Figura 16 – Coeficientes de variação dos analitos avaliados em replicatas da análise (n = 2) de três diferentes amostras de cerveja empregando tempo de dessorção de 5 minutos.	62
Figura 17 – Cromatogramas de íons totais da amostra IND-C e dos brancos com a utilização do tempo de dessorção da fibra de 5 e 15 min.	62
Figura 18 – Gráfico de variação dos analitos avaliados em replicatas da análise (n = 2) de três diferentes amostras de cerveja empregando tempo de dessorção de 15 minutos.	63
Figura 19 – Áreas médias do padrão interno n-butanol detectadas para as amostras de cerveja Pilsen industriais (sigla IND) e artesanais (sigla ART), representadas por barras, e os respectivos coeficientes de variação (CV%) entre replicatas (n = 2), representados por pontos.	64
Figura 20 – Gráfico <i>Boxplots</i> dos coeficientes de variação entre réplicas para cada analito dentre as cervejas Pilsen analisadas.....	65
Figura 21 – Cromatogramas de íons totais obtidos no planejamento Box-Behnken para cada um dos experimentos realizados.....	66
Figura 22 – Gráficos de valor previsto <i>versus</i> medido para os ésteres a) acetato de isoamila, b) octanoato de etila, c) acetato de 2-fenetila e d) decanoato de etila.	67
Figura 23 – Gráficos de Pareto para os ésteres a) octanoato de etila, b) decanoato de etila e c) acetato de 2-fenetila. As variáveis T, t e V indicam temperatura, tempo e volume, respectivamente. As letras sobrescritas “L” e “Q” indicam se a variável é linear ou quadrática na equação que descreve a superfície de resposta.	68
Figura 24 – Superfícies de resposta* obtidas para os ésteres a) octanoato de etila, b) decanoato de etila e c) acetato de 2-fenetila.	70
Figura 25 – Gráficos de valor previsto <i>versus</i> medido para os analitos a) ácido hexanoico e b) ácido decanoico.	71

Figura 26 – Gráficos de Pareto para os para os analitos a) ácido hexanoico e b) ácido decanoico. As variáveis T, t e V indicam temperatura, tempo e volume, respectivamente. As letras sobrescritas “L” e “Q” indicam se a variável é linear ou quadrática na equação que descreve a superfície de resposta.....	72
Figura 27 – Superfícies de resposta* obtidas para os analitos a) ácido hexanoico e b) ácido decanoico.....	73
Figura 28 – Gráficos de valor previsto <i>versus</i> medido para os analitos a) 1-hexanol, b) 5-nonanol e c) álcool isoamílico.....	74
Figura 29 – Gráficos de Pareto para os para os analitos a) 1-hexanol, b) 5-nonanol e c) álcool isoamílico. As variáveis T, t e V indicam temperatura, tempo e volume, respectivamente. As letras sobrescritas “L” e “Q” indicam se a variável é linear ou quadrática na equação que descreve a superfície de resposta.....	75
Figura 30 – Superfícies de resposta* obtidas para o a) 5-nonanol e b) álcool isoamílico.....	76
Figura 31 – Gráficos a) de valor previsto <i>versus</i> medido e b) de Pareto para o linalol.....	77
Figura 32 – Superfície de resposta* obtida para linalol.	78
Figura 33 – Coeficientes de variação para cada analito no planejamento <i>Box-Behnken</i>	78
Figura 34 – Gráfico de Áreas Normalizadas versus Experimento <i>Box-Behnken</i>	81
Figura 35 – Perfil de voláteis obtidos para cervejas artesanais e industriais, a partir das áreas cromatográficas médias corrigidas para cada analito.....	82
Figura 36 – <i>Biplot</i> da análise de componentes principais para as amostras de cerveja artesanais (ART) e industriais (IND) em relação aos ésteres, álcoois e ácidos orgânicos analisados.	85
Figura 37 – Áreas médias normalizadas dos ésteres nas cervejas Pilsen analisadas. As setas indicam as cervejas sem álcool.....	87
Figura 38 – Áreas médias normalizadas do linalol e do álcool β -fenetílico frente às cervejas Pilsen analisadas.....	88
Figura 39 – Áreas médias normalizadas para os ácidos orgânicos nas às cervejas Pilsen analisadas.....	90
Figura 40 – Análise de agrupamento hierárquico de cervejas Pilsen artesanais e industriais..	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores estipulados para variáveis e níveis do planejamento BBD.	55
Tabela 2 – Experimentos realizados no planejamento BBD.	56
Tabela 3 – Redução do fator de ganho do detector nos intervalos de saturação.	60
Tabela 4 – Parâmetros obtidos para os ésteres a partir da análise de variâncias, considerando-se interações lineares-quadráticas.	67
Tabela 5 – Parâmetros obtidos para os ácidos a partir da análise de variâncias, considerando-se interações lineares-quadráticas.	71
Tabela 6 – Parâmetros obtidos para os álcoois superiores a partir da análise de variâncias, considerando-se interações lineares-quadráticas.	75
Tabela 7 – Componentes principais da PCA e variâncias explicadas e cumulativas.	84
Tabela 8 – Parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de cerveja Pilsen analisadas.	92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Compostos voláteis produzidos pelas leveduras e suas características.	30
Quadro 2 – Tipos de cervejas e suas características organolépticas. ^{37,38}	32
Quadro 3 – Trabalhos encontrados na literatura em que três diferentes técnicas foram utilizadas para a análise de voláteis em cervejas.	33
Quadro 4 – Detectores comumente utilizados em Cromatografia a gás.	34
Quadro 5 – Características das diferentes técnicas de extração utilizadas em cervejas. O símbolo de “+” indica o nível associado entre a técnica e a respectiva característica (+ = baixa associação, ++ = associação intermediária, +++ = alta associação). A ausência do símbolo “+” indica que a relação entre a técnica e a característica citada não se aplica.	37
Quadro 6 – Polímeros comumente utilizados em SPME e estrutura de seus monômeros.	39
Quadro 7 – Fibras de SPME comercialmente disponíveis e suas aplicações.	40
Quadro 8 – Reagentes utilizados para a realização das soluções.	49
Quadro 9 – Cervejas Pilsen analisadas e suas respectivas informações.	50
Quadro 10 – Razões m/z utilizadas para obtenção das áreas e confirmação dos picos de cada analito.	52
Quadro 11 – Condições utilizadas nos testes para otimização do método cromatográfico.	59
Quadro 12 – Resumo de informações obtidas para cada analito após realização de planejamento experimental Box-Behnken. As variáveis T, t e V indicam temperatura, tempo e volume, respectivamente. As letras sobrescritas “L” e “Q” indicam se a variável é linear ou quadrática na equação que descreve a superfície de resposta.	79
Quadro 13 – Propriedades físico-químicas dos voláteis avaliados no Planejamento Box- Behnken.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

ATP – Adenosina trifosfato

ASBC – Sociedade Americana de Químicos de Cerveja

BBD – Planejamento *Box-Behnken*

BJCP – Programa de Certificação de Juiz de Cerveja

CAR – Carboxeno

CV – Coeficiente de variação

DHS – Extração estática por Headspace

DOE – Planejamento Experimental

DVB – Divinilbenzeno

EG – Etilenoglicol

GC – Cromatografia Gasosa (*Gas Chromatography*)

GC-FID – Cromatografia Gasosa acoplada a Detector de Ionização por Chama

GC×GC/TOF-MS – Cromatografia gasosa bidimensional abrangente com detector por Espectrometria de Massas por Tempo de voo

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

GC-MS/VUV – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas em série com detector de Ultravioleta à Vácuo

HCA – Ácidos hidroxâmicos

HS – Headspace

IN – Instrução Normativa

LLE – Extração líquido-líquido

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PA – Poliacrilato

PDMS – Polidimetilsiloxano

PEG – Polietilenoglicol

PI – Padrão interno

PTFE – Politetrafluoroetileno

SBSE – Extração sortiva em barra de agitação

SDE – Extração e destilação simultâneas

SFE – Extração com fluido supercrítico

SHS – Extração dinâmica por Headspace

SPE – Extração em fase sólida

SPME – Microextração em fase sólida

THC – Delta-9-tetrahydrocannabinol

TIC – Cromatograma de íons totais

UHPLC – Cromatografia líquida de ultra eficiência

LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celcius

eV – Elétron volts

mg L⁻¹ – Miligramas por litro

m/z – Razão massa-carga

µg L⁻¹ – Microgramas por litro

mol L⁻¹ – Concentração molar

P° – Graus Plato

ppm - Partes por milhão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	OBJETIVOS.....	21
2.1.	Objetivo Geral	21
2.2.	Objetivos Específicos	21
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1.	A Cerveja lager.....	22
3.2.	Processo produtivo da cerveja.....	24
3.2.1.	<i>O papel da levedura</i>	26
3.3.	O Mercado cervejeiro brasileiro.....	30
3.4.	Análise de voláteis em cerveja.....	32
3.4.1.	<i>Técnicas instrumentais para análise de voláteis</i>	32
3.4.2.	<i>Técnicas de extração e pré-concentração de voláteis em cervejas</i>	35
3.5.	Microextração em fase sólida.....	37
3.5.1.1.	<i>Materiais sorventes em SPME</i>	39
3.6.	Extração por headspace	41
3.7.	Parâmetros para o desenvolvimento do método HS-SPME.....	43
3.8.	Otimização multivariada.....	44
3.8.1.	<i>Planejamento Box-Behnken</i>	45
3.9.	Análise exploratória de dados.....	47
3.9.1.	<i>Análise de componentes principais (PCA)</i>	47
3.9.2.	<i>Análise hierárquica de agrupamentos (HCA)</i>	47
4	METODOLOGIA.....	49
4.1.	Preparo das soluções padrão.....	49
4.2.	Preparo das amostras de cerveja Pilsen	50
4.3.	Otimização da separação cromatográfica	51
4.3.1.	<i>Testes preliminares do método</i>	51
4.3.2.	<i>Condições cromatográficas otimizadas</i>	51
4.4.	Execução da microextração em fase sólida em modo headspace.....	52
4.4.1.	<i>Preparo dos vials</i>	52
4.4.2.	<i>Condicionamento da fibra</i>	53
4.4.3.	<i>Execução da extração</i>	53

4.4.4. Otimização do tempo de dessorção da fibra	54
4.4.5. Avaliação da variação entre as replicatas das cervejas Pilsen	55
4.5. Otimização multivariada da HS-SPME por planejamento Box-Behnken (BBD).....	55
4.6. Análises multivariadas.....	56
4.7. Análises físico-químicas.....	57
4.7.1. Extrato aparente	57
4.7.2. Teor alcoólico.....	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1. Otimização da separação cromatográfica	59
5.2. Otimização do tempo de dessorção da fibra	61
5.3. Avaliação da variação entre as replicatas das cervejas Pilsen.....	64
5.4. Otimização experimental da HS-SPME por planejamento Box-Behnken	66
5.5. Ésteres.....	66
5.6. Ácidos orgânicos	71
5.7. Álcoois.....	73
5.7.1. Álcoois superiores	74
5.7.2. Álcool monoterpênico.....	77
5.8. Definição das condições ótimas	78
5.9. Perfil de voláteis das cervejas Pilsen.....	81
5.10. Análise multivariada.....	84
5.10.1. Agrupamento 1 – Cervejas Pilsen não alcoólicas	86
5.10.2. Agrupamento 2 – Cervejas Pilsen industriais.....	87
5.10.3. Agrupamento 3 – Cervejas Pilsen com baixo teor de carboidratos (low carb).....	89
5.10.4. Cervejas Pilsen artesanais	90
5.11. Análises físico-químicas.....	92
6 CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	96
APÊNDICE A	105
APÊNDICE B.....	106
APÊNDICE C.....	107

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida fermentada composta por quatro componentes principais, sendo eles água, malte, lúpulo e leveduras.¹ De acordo com as matérias-primas utilizadas, podem ser produzidos diferentes estilos de cerveja que apresentam características, como sabor e aroma, distintas. O Brasil se destaca no setor cervejeiro como o terceiro país de maior consumo mundial² e, dentre a preferência de consumo, há uma predominância no estilo Pilsen, uma cerveja clara, de baixa fermentação, com menor presença de malte e considerada uma bebida leve e palatável,³ podendo ser consumida em diversas ocasiões.

A preferência dos consumidores por um estilo de cerveja leva em consideração o aspecto sensorial da bebida,⁴ como o aroma e o sabor, que está relacionado aos compostos voláteis liberados ao longo da produção da cerveja. Nesse contexto, as leveduras têm papel fundamental na síntese das principais classes de compostos responsáveis pelas características sensoriais, como álcoois superiores, ésteres e ácidos orgânicos,⁵ que podem agregar características florais, frutadas ou com aspecto gorduroso, por exemplo. Assim, compreender o perfil de voláteis da cerveja é importante para a etapa inicial de escolha de matérias-primas e das cepas de levedura, além de ser relevante para assegurar o controle de qualidade da bebida.⁶

Para a análise do perfil de voláteis em cervejas é necessário que os compostos sejam primeiramente isolados e pré-concentrados.⁷ Inicialmente, técnicas que envolviam o uso de solventes, como a extração líquido-líquido,⁸ eram utilizadas com esse propósito. No entanto, ao longo dos anos foram sendo desenvolvidas técnicas verdes, que minimizavam ou eliminavam a necessidade de solventes. Uma dessas técnicas amplamente utilizada desde sua criação, nos anos 90, é a microextração em fase sólida em modo headspace (HS-SPME),⁹ que apresenta alta sensibilidade para compostos voláteis e semi-voláteis.¹⁰ Após o processo de extração, a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas é uma técnica instrumental vastamente utilizada para a determinação dos compostos dos voláteis. Essa técnica apresenta alta sensibilidade, seletividade, versatilidade, e uma ampla gama de aplicações.⁶

O mercado cervejeiro pode ser dividido nas dimensões industrial, com produção em grande escala,³ e artesanal, que atende a mercados mais regionais.^{3,11} Na esfera artesanal, apesar da produção ser em menor escala, há um crescimento da demanda anual de consumo devido a busca dos consumidores por novas percepções de sabor e produtos de maior qualidade sensorial.³ Embora façam-se distinções em relação ao mercado entre cervejas

industriais e artesanais, não há distinção objetiva regulamentada por legislações ou padronização de composição química que diferencie as duas variedades. Desta forma, a análise exploratória do perfil de voláteis pode ser utilizada para averiguar a existência de semelhanças ou diferenças entre as amostras artesanais e industriais, perante as classes de analitos responsáveis pelo aspecto sensorial final da cerveja. Diante disso, o uso das técnicas HS-SPME e GC-MS para a determinação do perfil de voláteis em cervejas Pilsen artesanais e industriais será descrito neste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar amostras de cervejas Pilsen industriais e artesanais por meio do perfil de voláteis obtido por cromatografia a gás acoplada ao detector espectrômetro de massas.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar a pré-concentração dos compostos voláteis em cervejas Pilsen utilizando a microextração em fase sólida em modo headspace;
- Avaliar parâmetros de equilíbrio do processo de pré-concentração por meio de otimização multivariada;
- Avaliar o uso de padrão interno para correção de efeitos de matriz;
- Otimizar as condições cromatográficas para a análise qualitativa dos voláteis;
- Aplicar a Análise por Componentes Principais (PCA) e a Análise Hierárquica de Agrupamentos (HCA) para interpretação e agrupamento das cervejas em relação às classes de voláteis.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A Cerveja lager

O advento do consumo de bebidas alcoólicas, embora não possua data conhecida, pode ter se iniciado na pré-história, a partir da fermentação alcóolica natural oriunda do apodrecimento de frutas, do envelhecimento de mel, da danificação natural de cactos ou por seivas de algumas espécies de palmeiras. Ao longo dos anos, com o aperfeiçoamento das práticas e dos processos, as bebidas alcoólicas começaram a se tornar mais palatáveis.¹

A difusão do preparo e do hábito de consumo da cerveja, por sua vez, pode ter começado em 11000 a.C., pelos povos Babilônicos.¹² Desde então, a cerveja se tornou uma bebida popular na Mesopotâmia e no Egito. Arqueólogos encontraram um poema dedicado a Ninkasi, a Deusa da Cerveja, datado por volta de 1800 a.C, o que demonstrou haver na época a associação da cerveja à mitologia. Além disso, há registros do uso da bebida como atividade da realeza, na religião e na medicina, bem como do uso do lúpulo, aplicado pela primeira vez em 822 d.C.¹

Com o passar das gerações, o conhecimento sobre a cerveja e das técnicas utilizadas para produzi-la foram sendo aprimorados. Assim, em 1516 houve o surgimento da Lei de Pureza Alemã, instaurada a partir da Lei de Pureza da Baviera (*Reinheitsgebot*). Segundo a Lei da Pureza, a cerveja deveria ser composta por água, cevada e lúpulo. Na época, não se tinha conhecimento sobre o papel das leveduras no processo.^{1,5} Somente em 1680 a levedura foi descoberta, a partir da criação do microscópio, realizada por Antonie van Leeuwenhok, e, séculos depois, em 1837, foi descoberta como ser vivo. A partir de então, a elucidação do processo de fermentação, bem como a fundamentação da microbiologia moderna, realizadas pelo francês Louis Pasteur, contribuíram para que em estudos posteriores fosse possível isolar cepas de levedura e reduzir a influência de contaminantes.⁵

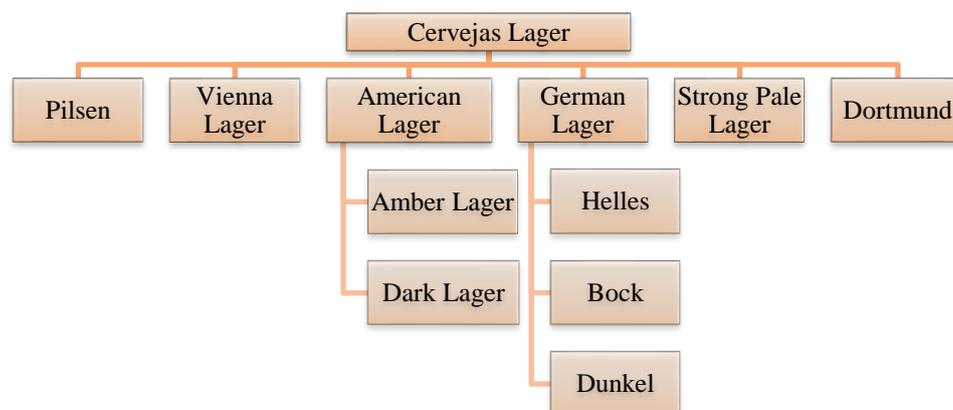
A partir das novas descobertas, compreendeu-se que as cervejas que predominaram na Baviera até o século XVI eram do tipo Ale, também conhecidas como de alta fermentação. Essas cervejas possuíam forte caráter frutado e eram produzidas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* em temperaturas que variavam de 15 a 26 °C. No entanto, durante os meses mais frios do ano, essas cervejas eram armazenadas em cavernas frias e escuras e então, a partir das novas condições de temperatura, houve o cruzamento entre uma espécie tolerante ao frio, a *S. eubayanus*, e a *S. cerevisiae*, gerando uma nova espécie de levedura híbrida, a *S. pastorianus*. A cerveja proveniente da fermentação pela *S. pastorianus* foi denominada Lager, do alemão *lagern* que significa “armazenar”.¹³

Em uma hipótese recente, a partir da análise de registros históricos os pesquisadores Hutzler e colaboradores (2023) acreditam que o surgimento da cerveja Lager pode ter sido, ao contrário do que se presumia até então, a partir da contaminação da *S. cerevisiae* na *S. eubayanus*. Segundo os autores, a *S. eubayanus* já era encontrada em uma pequena cidade da Boêmia, em 1548, em cervejas de trigo, em uma contravenção à Lei de Pureza da Baviera. Quando todos os produtores da família morreram, a produção da cerveja de trigo foi levada para a cervejaria da corte, em Monique, e a partir daí aconteceria a hibridização da *S. pastorianus*, assim como a posterior disseminação de suas cepas pela Europa e a nível mundial.¹⁴

Por ser oriunda da combinação do material genético entre as cepas de dois tipos de levedura, a *S. pastorianus* apresentou a capacidade fermentativa da *S. cerevisiae* e a tolerância a menores temperaturas herdada da *S. eubayanus*, em que o processo de fermentação pode ser conduzido em temperaturas de 8 a 14 °C.¹³ Além disso, as cervejas Lager produzidas foram denominadas de baixa fermentação, visto que as leveduras realizavam a fermentação no fundo do recipiente de reação.¹⁵

A produção da cerveja Lager foi aperfeiçoada ao longo dos séculos em diferentes estilos, como ilustrado na Figura 1.¹⁶ Essas cervejas foram ganhando espaço na preferência dos consumidores por serem leves, apresentarem aroma suave e serem de fácil degustação. A cerveja do tipo Pilsen, por exemplo, criada em 1842 na antiga Tchecoslováquia, é um dos estilos mais populares até os dias atuais.⁵ Além disso, em se tratando de uma esfera global, atualmente 84% do consumo é de cervejas Lager.¹³

Figura 1 – Alguns dos diferentes estilos de cervejas Lager.



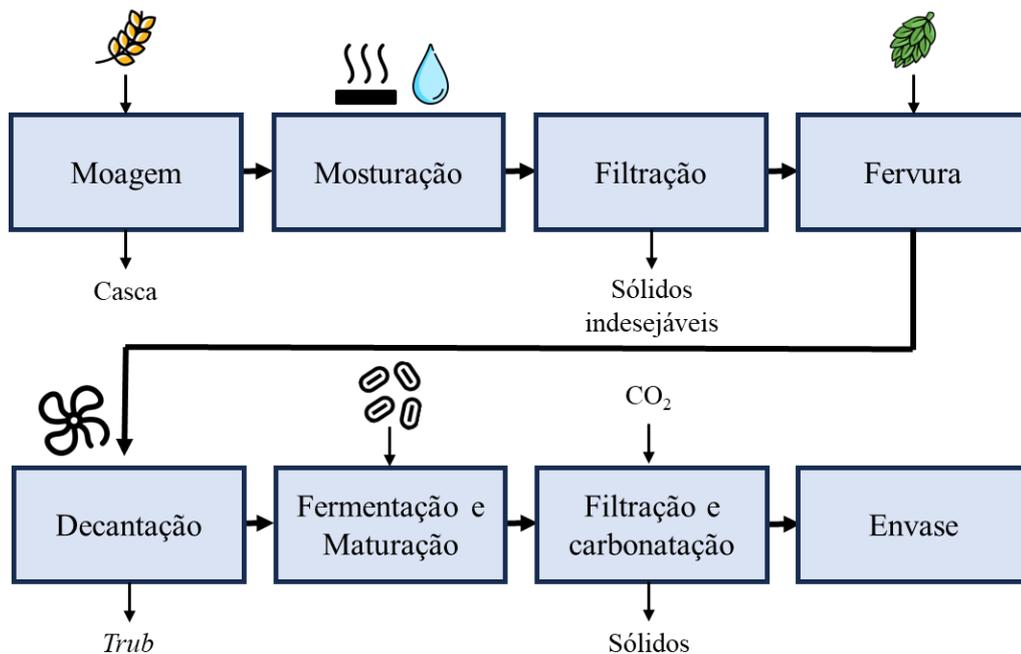
Fonte: Adaptado de Kremer Cervejaria (2022).

Para compreender as características da cerveja Lager e o papel da levedura no processo, é importante entender como ocorre o processo produtivo de sua fabricação.

3.2. Processo produtivo da cerveja

Há três processos bioquímicos consecutivos que ocorrem na produção de qualquer cerveja, sendo eles: a formação de enzimas, a partir da germinação do malte; a conversão do amido presente no malte em açúcar e a consequente fermentação do açúcar a etanol e gás carbônico (CO₂).⁵ O processo de produção pode ser melhor compreendido a partir do esquema mostrado na Figura 2.

Figura 2 – Etapas do processo produtivo da cerveja, incluindo alguns dos principais componentes adicionados.



Fonte: Ícones gratuitos com Licença de Merchandising de *flaticon.com*.

Como pode ser observado na Figura 2, no início do processo o malte passa pela etapa de moagem e os grãos são reduzidos, com o intuito de expor o endosperma e facilitar a posterior ação das enzimas.¹⁷ Em seguida, a água é adicionada ao malte, produzindo um líquido doce e de coloração amarronzada (mosto) em que estão presentes os açúcares que serão utilizados na fermentação. A temperatura da mosturação é controlada para que haja liberação enzimática e formação de sabor.^{6,13}

Nesse processo, além dos açúcares podem estar presentes sólidos contendo altos teores de proteínas, ácidos graxos, enzimas coaguladas e outras substâncias que podem prejudicar o

sabor e o aspecto final da cerveja. Desta forma, a filtração é realizada para remoção desses sólidos indesejáveis.¹⁷

O mosto é, então, fervido para que ocorra estabilidade biológica, bioquímica e coloidal¹⁷ e o lúpulo é adicionado, com o intuito de agregar amargor e aroma na bebida.⁶ No fim do processo, o mosto é decantado sob resfriamento e agitação, para separação de partículas em suspensão, como proteínas coaguladas. Nesta etapa é gerado um dos principais resíduos do processo cervejeiro, o *trub*, composto pelos sólidos que após o processo de decantação se depositam ao fundo da caldeira. Caso não removido, o *trub* pode impactar em sabores não desejáveis na cerveja.¹⁷

A posteriori, ocorre o processo de fermentação. Em um primeiro momento, as leveduras adicionadas metabolizam os açúcares fermentescíveis do mosto, como a glicose e a maltose, produzindo etanol, gás carbônico e diversos compostos voláteis, que influenciam no aroma e no sabor da cerveja. Após o período de fermentação, que pode ser de alguns dias ou semanas,⁶ as leveduras são removidas da cerveja, a qual passa para o processo de maturação, conduzida em baixa temperatura,¹⁷ para que ganhe corpo e mais perfil aromático.⁶

A partir daí, a cerveja pode ser novamente filtrada, para que qualquer partícula remanescente seja eliminada, e é carbonatada, com a injeção de CO₂. Por fim, a cerveja é envasada, com controle da pressão interna das embalagens. E uma etapa a mais, a cerveja envasada pode ser pasteurizada, sendo submetida a alta temperatura por alguns segundos e, em seguida, resfriada com o intuito de eliminar microrganismos que podem deteriorar a bebida. Geralmente esse processo é realizado em cervejarias industriais, de grande porte.¹⁷

Os componentes principais do processo – água, malte, lúpulo e leveduras – influenciam nas características da cerveja produzida. Nesse contexto, a água tem um papel crucial no processo, visto que a cerveja é composta de 90% a 95% por esta matriz. Desta forma, a qualidade e composição físico-química da água influencia na qualidade da cerveja produzida. Para todos os estilos, a composição mineral da água necessita ser controlada e, mais especificamente para a cerveja Pilsen, a água deve apresentar baixas concentrações de cálcio e magnésio na forma de sulfatos, bicarbonatos e cloretos, substâncias que influenciam o pH do mosto.¹⁸ Além disso, parâmetros importantes, como alcalinidade e presença microbiológica devem ser controlados.⁶

Além da água, na fabricação da cerveja é necessária uma fonte de amido e utiliza-se o malte para esta finalidade. O objetivo da maltagem é a elevação do conteúdo enzimático dos cereais utilizados, a partir da germinação controlada dos grãos,¹⁵ em que ocorre a síntese de

amilases, proteases, glucanases, dentre outras substâncias. Esses compostos potencializam o processo de quebra de macromoléculas como proteínas, amido e glucano, advindos das matérias-primas utilizadas, em compostos menores e solúveis no mosto.¹⁸ As cervejarias utilizam tipicamente o malte de cevada, por apresentar um alto teor de carboidratos, aminoácidos e vitaminas, além de proteínas em quantidade e qualidade suficientes para a nutrição das leveduras.^{6,18} Além disso, a cevada contém polifenóis que contribuem para a atividade antioxidante.^{6,19}

A cerveja também tem como característica o amargor e isto se deve à presença do lúpulo, espécie *Humulus lupulus* que embora pertença à família Cannabaceae não apresenta substâncias alucinógenas, como o canabinoide delta-9-tetrahidrocanabinol (THC). As flores femininas dessa espécie possuem glândulas amareladas que contêm lupulina, composta por resinas e óleos essenciais responsáveis pelo aroma e amargor do lúpulo.¹⁸ Na fabricação da cerveja, o lúpulo é adicionado durante a fervura do mosto. Nesse processo, os α -ácidos presentes na lupulina são isomerizados a iso- α -ácidos, substâncias solúveis e que agregam a característica de amargor no sabor da cerveja. O aroma, por sua vez, é proveniente da mistura de compostos voláteis presentes nos óleos essenciais do lúpulo, liberados no decorrer do processo.⁶ Dentre esses compostos, comumente são identificados hidrocarbonetos das famílias dos terpenos,¹⁸ como linalol e geraniol, que conferem aspecto floral e frutado à cerveja,²⁰ bem como ésteres e ácidos orgânicos.^{18,21}

A adição de lúpulo também tem ação antifúngica e bactericida, contribuindo para a redução de contaminação microbiológica na cerveja. Além disso, a presença de polifenóis e saponinas no lúpulo pode influenciar na estabilidade do sabor e da espuma da cerveja.^{6,18}

3.2.1. O papel da levedura

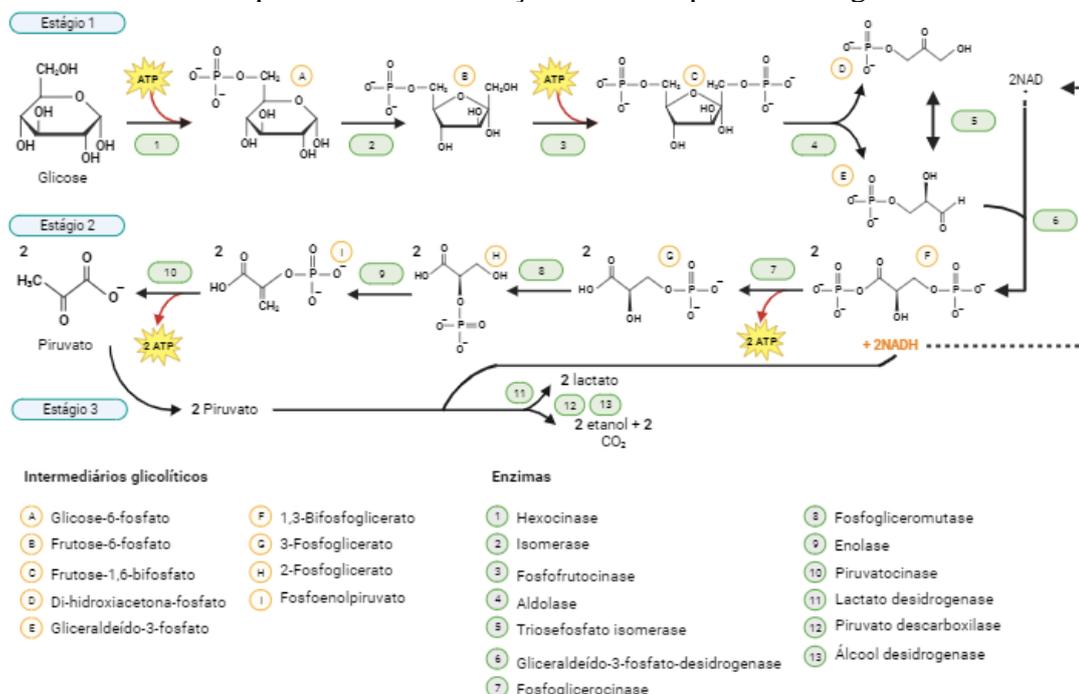
Além dos componentes anteriormente mencionados, as leveduras têm papel crucial na produção da cerveja. Por definição, as leveduras são microrganismos unicelulares que podem obter energia por meio do processo de respiração (processo aeróbico) ou por fermentação (processo anaeróbico).⁵ Esses processos são as duas principais estratégias em quimiorganotróficos, organismos que usam compostos químicos orgânicos como fonte de energia.²²

Na fabricação da cerveja, após a adição do malte e do lúpulo, o mosto é resfriado e aerado e só então as leveduras são adicionadas. Desta forma, no mosto aeróbico as leveduras crescem e se reproduzem rapidamente, ocorrendo o processo de respiração, visto que o ATP (adenosina trifosfato) é produzido em quantidade muito superior em comparação à

fermentação.^{22,23} Em condições aeróbicas, as leveduras oxidam o piruvato a acetato (acetil-CoA) e posteriormente a CO_2 e H_2O , por meio do ciclo do ácido cítrico.²³ No entanto, quando leveduras cervejeiras são expostas a um meio com alta disponibilidade de açúcares ocorre o efeito *Crabtree* em que parte do ciclo se mantém anaeróbico para produção de etanol, em um processo respiro-fermentativo.²⁴

Durante o processo de fermentação alcoólica, a glicose é convertida em piruvato, no processo denominado glicólise ou via de *Embden-Meyerhof-Parnas*, mostrado na Figura 3, em que as letras indicam os compostos formados e os números denotam as enzimas envolvidas nas reações.²²

Figura 3 – Processo bioquímico de fermentação alcoólica por meio da glicólise.



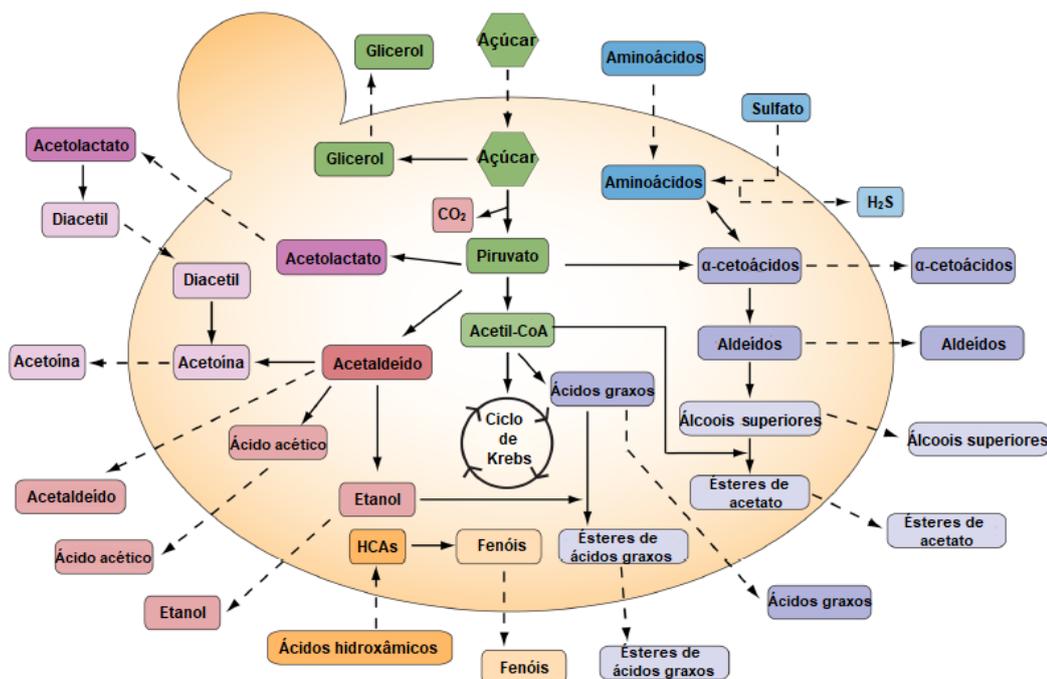
Fonte: Criado com *biorender.com* baseado em Madigan et al. (2016). A imagem ampliada encontra-se no Apêndice A, para melhor visualização.

No processo bioquímico apresentado na Figura 3, inicialmente ocorre a fosforilação da glicose, a partir de um grupo fosfato pertencente à uma molécula de ATP. A glicose-6-fosfato (A) é produzida e convertida a frutose-6-fosfato (B). A posteriori, a fosforilação ocorre por mais duas vezes, gerando o composto frutose-1,6-bifosfato (C). A partir daí, ocorre a quebra da frutose-1,6-bifosfato em dois compostos, di-hidroxiacetona-fosfato (D) e seu isômero gliceraldeído-3-fosfato (E), que é oxidado a 1,3-bifosfoglicerato (F). Em seguida, ocorre uma dupla desfosforilação produzindo moléculas de 3-fosfoglicerato (G). Este composto é então convertido a 2-fosfoglicerato (H) e, posteriormente, a fosfoenolpiruvato (I) que, a partir da enzima piruvatocinase, é convertido em piruvato (ácido pirúvico).^{5,22}

Na etapa final da fermentação alcoólica, o piruvato é reduzido a etanol (álcool etílico), com a produção consecutiva de CO_2 .^{5,22} O processo fermentativo é controlado por fatores como concentração de etanol formado, pH do meio e quantidade remanescente de açúcar. A partir desse ponto, as leveduras são removidas e a cerveja passa pelo processamento final.²³

Como resultado da fermentação, além do álcool as leveduras também produzem substâncias que influenciam no sabor e nas características da cerveja. Uma parte desses coprodutos podem ser aldeídos, compostos sulfurosos e diacetil, presentes em cervejas ainda não maduras, e que em altas concentrações prejudicam a qualidade da bebida, mas que podem ser removidos bioquimicamente a partir da etapa de maturação. Os álcoois superiores e ésteres, por sua vez, são coprodutos característicos de cervejas maturadas e necessários para garantir uma boa qualidade final da cerveja.⁵ Além desses compostos, o metabolismo de aminoácidos realizado pelas leveduras também pode gerar ácidos orgânicos que influenciam no sabor da cerveja.⁵ As vias biossintéticas para formação de compostos voláteis durante o processo de fermentação estão apresentadas na Figura 4.²⁵

Figura 4 – Vias biossintéticas de formação de voláteis durante a fermentação. As setas tracejadas indicam processos que ocorrem permeando (entrando ou saindo) a membrana da levedura. As cores estão relacionadas com o tipo de processo envolvido, como a redução de açúcares (verde), a produção de álcoois e ésteres (lilás), processos que ocorrem durante a maturação da cerveja (rosa) e produção de fenóis (laranjado) a partir dos ácidos hidroxâmicos (HCAs).



Fonte: Adaptado e traduzido de Dzialo et al. (2017). Uso da imagem permitido sob licença Creative Commons CC BY 4.0 DEED (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>). Licença disponível no Apêndice B.

Os álcoois superiores são todos os álcoois que possuem mais de dois átomos de carbono e são produzidos quando as leveduras metabolizam aminoácidos como fonte de nitrogênio. Os álcoois formados afetam o sabor e aroma da cerveja e podem, ainda, reagir com ácidos carboxílicos e produzir ésteres aromatizados que contribuem para um aspecto frutado da cerveja.²⁶ Bioquimicamente, a formação dos álcoois superiores ocorre a partir de α -cetoácidos que são descarboxilados a aldeídos e posteriormente desidrogenados. A posteriori, os ésteres são formados mediante a reação entre os álcoois superiores com enzimas acetil-CoA ou acil-CoA.²⁷

Os ésteres são os compostos mais importantes na composição do aroma da cerveja, agregando aspecto frutado e floral à bebida, e são formados durante a fermentação, por meio da esterificação de ácidos graxos ou de álcoois superiores. Contudo, em concentrações altas podem gerar sabor amargo e frutado em excesso.⁵ Os ésteres formados e suas concentrações dependem, dentre outros fatores, da cepa de levedura utilizada e da temperatura da fermentação. Como exemplo, para algumas cervejas do tipo Lager, com a Pilsen, são produzidos ésteres em menores concentrações, tornando a bebida mais leve, se comparada a cervejas Ale.²⁶

Nesse contexto, com relação à fermentação de cervejas Lager, as cepas das leveduras *S. pastorianus* podem ser de dois tipos, Saaz ou Frohberg. A cepa Saaz possui maior tolerância a menores temperaturas, enquanto a cepa Frohberg pode usar maltotriose como fonte de carbono. Embora ainda haja muito a ser descoberto sobre a relação entre os diferentes genomas da *S. pastorianus* e a produção de aroma e sabor durante a fermentação, o perfil aromático de ambas pode variar significativamente de acordo com os parâmetros utilizados na fermentação, como temperatura, oxigênio dissolvido e concentração de açúcares. No entanto, um estudo comparativo utilizando parâmetros similares de fermentação para as duas cepas relatou que um perfil de voláteis mais complexo foi obtido a partir da cepa Frohberg, com maior produção de ésteres.¹³

Em geral, os compostos produzidos na fermentação contribuem para o perfil de voláteis da cerveja²⁷ e podem influenciar positiva ou negativamente na qualidade do produto final, sendo que aspectos desejáveis para um estilo de cerveja podem ser considerados imperfeições para outro.²⁶ Desta forma, o estudo e a caracterização de cervejas em relação aos perfis de voláteis é uma área que vem crescendo e ganhando importância para o controle da qualidade do produto final, além da produção de novas variedades.

Na literatura é possível encontrar vários compostos voláteis já estudados, bem como a descrição do aroma e sabor que cada um agrega à cerveja^{5,20,28-31}. O limiar de percepção dessas substâncias varia, sendo que quanto menor o valor, mais facilmente é perceptível ao paladar. No Quadro 1 são apresentados alguns desses voláteis, a descrição do aspecto palatável e o limite de percepção.

Quadro 1 – Compostos voláteis produzidos pelas leveduras e suas características.

Composto Volátil	Descrição do Aroma/Sabor ²⁰	Limiar de percepção (mg L ⁻¹)
Álcoois:		
n-hexanol	Coco, grama, desagradável	4 ³⁰
n-propanol	Alcoólico, aspecto de solvente	800 ³⁰
Álcool isoamílico	Banana, aromático, doce, vinoso	70 ³⁰
Álcool β-fenetílico	Floral, aroma de rosas	125 ³⁰
Ácidos Orgânicos:		
Ácido acético	Vinagre, pungente	200 ³¹
Ácido hexanóico (caprótico)	Óleo vegetal, suor	8 ³¹
Ácido decanóico (cáprico)	Aroma de bode	10 ⁵
Ácido octanóico (caprílico)	Óleo vegetal, aroma de bode	15 ³¹
Ácido isovalérico	Rançoso, queijo, suor	1,5 ⁵
Ésteres:		
Acetato de 2-fenetila	Mel, adocicado, aroma de rosas	3,8 ³⁰
Acetato de isoamila	Solvente, frutado, banana, pera	1,2 ³⁰
Hexanoato de etila	Maçã azeda, frutado, solvente	0,2 ³⁰
Octanoato de etila	Maçã azeda, frutado, doce	0,9 ³⁰
Decanoato de etila	Caprílico, frutado, maçã	1,5 ³⁰

A concentração e a natureza dos voláteis podem variar entre os estilos de cerveja, sendo importante a identificação dos voláteis para comparação das diferenças existentes e atribuição das distinções no quesito de individualidade e requinte das cervejas. Isso pode ser levado em conta ao se comparar cervejas consideradas artesanais, comumente produzidas sem adição de produtos para a aceleração dos processos de fabricação, em comparação com cervejas denominadas industriais.³²

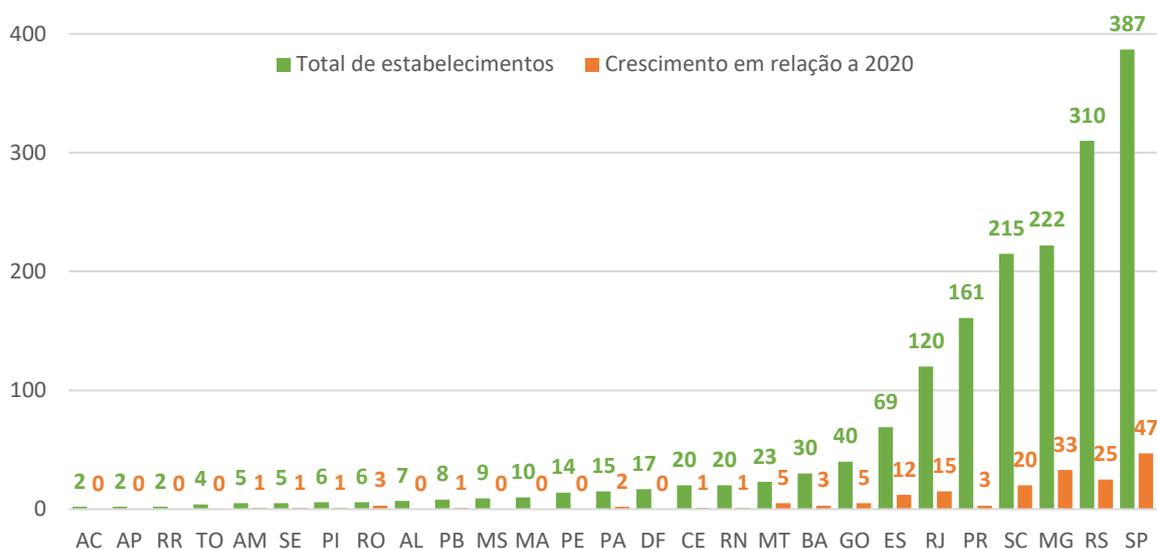
3.3. O Mercado cervejeiro brasileiro

No Brasil, o Decreto nº 9.902 do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) define a cerveja como “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.”³³ É permitido que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte seja substituída parcialmente por um adjunto cervejeiro, como cereais malteados ou não-malteados, ingredientes de origem vegetal e mel.³⁴

O Brasil se destaca no setor cervejeiro como o terceiro país de maior consumo mundial.² Em 2022, segundo o MAPA, o país apresentou um total de 1729 cervejarias registradas.³⁵ Essas cervejarias se concentram principalmente na região Sudeste do país e Minas Gerais aparece em terceiro lugar, como mostrado no gráfico da Figura 5.

Figura 5 – Total de estabelecimentos registrados por Estados no Brasil em 2022.



Fonte: Criado com *Microsoft Excel* baseado em Ministério da Agricultura e Pecuária (2023).

O mercado cervejeiro pode ser dividido em duas dimensões: hegemônica e alternativa. A hegemônica ou industrial (*comercial beer* ou *mass-produced beer*, em inglês) é constituída por cervejarias com produção em larga escala, com o intuito de obter celeridade nos processos de produção e menor custo, com alto volume de vendas,³ e que fazem uso de aditivos como antioxidantes, acidulantes e estabilizantes.¹⁵ A alternativa, também conhecida como artesanal (*craft beer*, em inglês), apresenta processo produtivo sem uso de aditivos e com etapas mais lentas de fermentação e maturação, com a proposta de fornecer cervejas de alta qualidade, com maior variedade de estilos assim como atender aos mercados regionais, com comercialização em menor escala.^{3,11}

O setor das cervejas industrializadas é marcado pela associação de empresas nacionais e multinacionais em grandes conglomerados, responsáveis pela produção e comercialização de 98% das cervejas consumidas no Brasil, com predominância de cerveja Pilsen.³ Na esfera artesanal, por sua vez, há um crescimento da demanda anual que pode ser explicado pela

busca dos consumidores por novas percepções de sabor e pela valorização da produção local, que é vista como um elemento representativo de qualidade superior.³

Embora façam-se distinções mercadológicas entre cervejas industriais e artesanais, ainda não há distinção objetiva regulamentada por legislações ou padronização de composição química que diferencie as duas variedades.

3.4. Análise de voláteis em cerveja

Os compostos voláteis formados durante o processo produtivo influenciam nas propriedades organolépticas da cerveja, podendo afetar a qualidade.³⁶ Além disso, contribuem para as diferentes características dentre os estilos, como mostrado no Quadro 2. Essas diferenças impactam, por consequência, na escolha do consumidor como por exemplo a predominância do consumo brasileiro de cervejas Pilsen, que seguem o padrão internacional de cerveja clara, com menos malte e que resulta em um produto leve e mais palatável ao gosto dos consumidores.³

Quadro 2 – Tipos de cervejas e suas características organolépticas.^{37,38}

Fermentação	Estilo da Cerveja	Aparência	Aroma e Sabor
Baixa (Lager)	Pilsen	Clara	Leve aspecto de malte, herbal, frescor, floral
	Dortmund	Clara	Suave aroma de malte, leve sensação de lúpulo
	Vienna	Clara	Presença mais intensa de malte e sabor de cereal e torrada
	München	Escura	Biscoito, pão, caramelo, chocolate, nozes
Alta (Ale)	Porter	Escura	Dulçor de malte, cacau, caramelo, frutado
	Stout	Escura	Grão torrado, chocolate, caramelo, café
	India Pale Ale	Clara	Forte presença de aspecto floral, cítrico e frutado
	Red Ale	Escura	Grão, malte, leve aspecto de caramelo e torrada

Pelo fato de impactarem tanto no sabor quanto no aroma, a caracterização das cervejas em relação ao perfil de voláteis é importante para a etapa inicial de escolha de matérias-primas e das cepas de leveduras, bem como para assegurar o controle de qualidade da bebida.⁶ A caracterização do perfil de voláteis pode ser realizada a partir do uso de diferentes técnicas analíticas, abordadas nos tópicos seguintes.

3.4.1. Técnicas instrumentais para análise de voláteis

Uma técnica muito utilizada para a análise de voláteis em cerveja é a cromatografia a gás. O cromatógrafo a gás é um equipamento capaz de realizar de forma célere análises qualitativas e quantitativas de compostos existentes em baixas concentrações em variados tipos de amostras, quando associado aos diversos tipos de sistemas de detecção existentes.³⁹

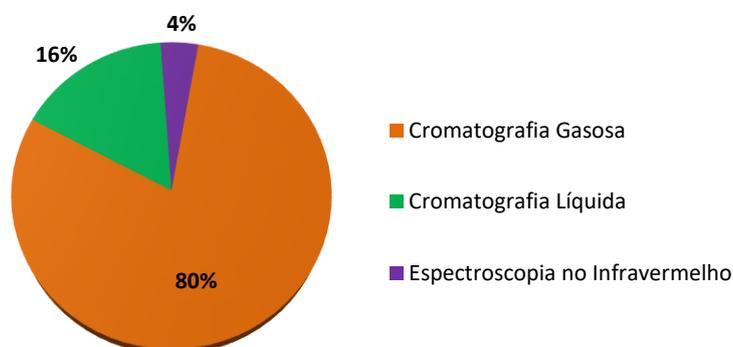
Além da cromatografia gasosa, a cromatografia líquida e a espectroscopia de infravermelho também já foram aplicadas em cervejas de diferentes estilos para a determinação dos compostos voláteis, como mostrado no Quadro 3.

Quadro 3 – Trabalhos encontrados na literatura em que três diferentes técnicas foram utilizadas para a análise de voláteis em cervejas.

Matriz	Técnica Utilizada	Objetivos	Método de extração dos voláteis	Referência
Cervejas Lager	Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)	Análise quantitativa de compostos voláteis a partir de otimização inicial dos parâmetros de extração por superfície de resposta	Microextração em fase sólida por <i>headspace</i> (HS-SPME)	28
Cervejas Pilsen e Stout	Cromatografia líquida de alta performance por captura de elétrons (HPLC-ECD)	Análise de compostos voláteis fenólicos (4-vinylphenol e 4-vinylguaiacol)	Hidrólise alcalina dos ácidos fenólicos	40
Cervejas Lager e Ale	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	Determinação de ácido lático utilizando análise multivariada	-	41

No entanto, após realizar uma consulta na base de dados *Web of Science*TM com relação ao total de artigos originais e de revisão publicados até o momento e que englobam as diferentes técnicas para a análise de voláteis em cerveja, é notável a maior porcentagem de trabalhos utilizando-se GC, como mostrado no gráfico da Figura 6, devido a sua versatilidade.

Figura 6 – Porcentagem de artigos científicos que contemplam diferentes técnicas analíticas para análise de voláteis em cervejas.



Diferentes tipos de detectores podem ser acoplados ao GC e esses dispositivos têm a finalidade de converter variações na massa, concentração ou composição dos componentes da amostra ou do gás de arraste em sinais elétricos. A partir dos sinais elétricos, são gerados os

picos constituintes dos cromatogramas, sinais gráficos típicos da cromatografia, tornando possível a identificação e quantificação dos compostos.⁴²

A escolha do detector em um sistema específico de detecção depende principalmente das características físico-químicas do analito e de sua concentração na amostra. Além disso, outros fatores como a presença de interferentes (concomitantes), a complexidade da análise (separação de muitos compostos simultaneamente) e o custo do equipamento também podem influenciar nessa escolha.^{42,43} Alguns dos detectores utilizados com GC para análise de voláteis em cervejas estão dispostos no Quadro 4.

Quadro 4 – Detectores comumente utilizados em Cromatografia a gás.

Detector	Aplicação em cervejas	Vantagem	Limitação
Espectrômetro de Massas (MS)	Comparação do perfil de voláteis entre diferentes tipos de cervejas ⁴⁴	Alta sensibilidade, seletividade, versatilidade, ampla gama de aplicações ⁶	Não pode ser aplicado para analitos termolábeis ⁶
Ionização em chama (FID)	Análise de voláteis de diferentes classes em cervejas Pilsen ⁷	Alta robustez, custo acessível, baixo limite de detecção para alcanos ⁴⁵	Seletividade limitada, baixa sensibilidade para compostos em menores concentrações ⁴⁵
Captura de elétrons (ECD)	Análise de dicetonas vicinais (2,3-butanodiona e 2,3-pentanedione) ^{6,46}	Sensível, preciso e seletivo para compostos que tem maior afinidade por elétrons ⁶	Faixa dinâmica linear limitada ⁶
Detector de nitrogênio-fósforo (NPD)	Análise de compostos α -dicarbonílicos ⁴⁷	Baixos limites de detecção ⁴⁸	Seletivo apenas para compostos orgânicos que contenham nitrogênio e fósforo ⁴⁸
Espectroscopia de ultravioleta à vácuo (VUV)	Análise exploratória de voláteis em cervejas India Pale Ale, Blonde e Hefeweizen ⁴⁹	Alta seletividade para isômeros e compostos com espectros de massa similares ⁴⁹	Podem haver incertezas na identificação dos compostos, sendo necessárias outras técnicas para confirmação ⁴⁹
Emissão atômica (AED)	Determinação de selênio e compostos voláteis sulfurosos ⁵⁰	Alta seletividade para elementos específicos e baixos limites de detecção ⁵⁰	A resposta em qualquer comprimento de onda específico pode ser afetada por fatores que envolvem o plasma ⁵¹
Olfatometria (O-MS)	Análise de álcoois superiores e ésteres em cervejas sem glúten ⁵²	Alta eficiência na detecção de voláteis e suas estruturas químicas simultaneamente ⁵³	Tempos de retenção distintos para O (pressão atmosférica) e MS (vácuo). Necessidade de instalação de um aparato ⁵³

Os acoplamentos com GC apresentados no Quadro 4 fazem parte da cromatografia unidimensional (1D-GC). Uma técnica atual que tem sido vastamente explorada é a cromatografia a gás bidimensional abrangente (2D-GC ou GC×GC). Na GC×GC a amostra é separada inicialmente em uma coluna de GC convencional e, em seguida, os analitos são introduzidos, por meio de um modulador, em uma segunda coluna de GC de diferente polaridade, o que permite a separação adicional e a obtenção de informações mais detalhadas sobre os componentes da amostra.¹⁰ As vantagens da GC×GC são a maior resolução, a detecção de compostos em baixas concentrações e a análise de misturas complexas, já sendo utilizada para análise de voláteis em cervejas de diferentes tipos.⁵⁴⁻⁵⁶ No entanto, trata-se de um equipamento de altíssimo custo de aquisição, operação e manutenção.

3.4.2. Técnicas de extração e pré-concentração de voláteis em cervejas

Para realizar a análise dos voláteis utilizando-se cromatografia a gás é necessário que primeiramente haja o preparo da amostra. Uma das razões para tal é que a injeção direta da amostra no GC pode acarretar contaminação do equipamento, visto que a cerveja também contém compostos não voláteis.^{6,36} Além disso, uma vez que a cerveja apresenta uma matriz complexa e com analitos presentes em baixas concentrações, é necessário que esses compostos sejam inicialmente isolados e pré-concentrados.⁷

Algumas técnicas já utilizadas para este propósito podem ser baseadas no uso de solventes, como a extração líquido-líquido (LLE),^{8,57} a extração e destilação simultâneas (SDE),^{58,59} e a extração com fluido supercrítico (SFE).⁶⁰⁻⁶² Além disso, existem as técnicas em que são utilizados mecanismos de sorção, como a extração sortiva em barra de agitação (SBSE),^{63,64} a extração em fase sólida (SPE),⁶⁵⁻⁶⁹ e a microextração em fase sólida (SPME).^{7,9,27,70-73} Ademais, a extração por headspace (HS) é amplamente utilizada, podendo ser do tipo dinâmica (SHS) ou estática (DHS).⁷⁴

A extração líquido-líquido trata-se de uma técnica em que são utilizados solventes orgânicos para extrair analitos, usualmente utilizada para a determinação de álcoois superiores em bebidas alcóolicas.^{8,57} Embora seja de baixo custo, os altos volumes de solventes utilizados são danosos à saúde humana e ao meio ambiente, o que levou à redução do uso da técnica. Como uma alternativa, foi desenvolvida a microextração líquido-líquido dispersiva em que são usados volumes menores de solventes, a nível de apenas alguns microlitros.⁸

Outra técnica, a extração e destilação simultânea é realizada utilizando-se um aparato denominado Likens–Nickerson, em que as propriedades do sistema de destilação e de uma extração líquido-líquido são combinados.^{58,59} No processo, é possível extrair compostos

orgânicos voláteis (VOCs) presentes em matrizes complexas, com aplicação em análises de alimentos e bebidas, como na determinação de ésteres em cervejas.⁵⁸ Embora seja uma técnica que apresente uma alta eficiência de extração e minimização do uso de solventes, é requerida uma habilidade prática do analista, visto que a temperatura ao longo do processo deve ser cuidadosamente controlada. Além disso, é uma técnica que demanda maior tempo para ser executada.⁵⁸

A extração com fluido supercrítico surgiu como uma alternativa à extração líquido-líquido e à destilação por arraste de vapor.⁶⁰ A técnica usa uma quantidade mínima de solventes orgânicos e é mais rápida, em comparação com as extrações anteriormente mencionadas. Na análise de cervejas já foi utilizada para análise de álcoois, ésteres, ácidos graxos,⁶⁰ terpenos e outros voláteis advindos do lúpulo.⁶² Contudo, a seletividade da extração com fluido supercrítico depende das características físico-químicas do analito,⁶⁰ bem como do ajuste adequado dos parâmetros de análise, como vazão do solvente, temperatura e pressão.⁶¹

A extração em fase sólida foi criada na década de 1970 com o intuito de minimizar as desvantagens da extração líquido-líquido. O princípio de separação entre as duas técnicas é similar, envolvendo a partição dos analitos em duas fases. No entanto, na SPE essa partição se dá entre uma fase líquida e uma fase sólida, em que os analitos tem maior afinidade pela fase sólida do que pela amostra na qual estão inseridos, ficando retidos ou sorvidos. Mais adiante, os analitos são eluidos pela aplicação de um solvente com alta afinidade, tornando possível a posterior identificação e quantificação desses compostos.⁶⁵ O processo de SPE pode ser parcial ou completamente automatizado, reduzindo o tempo de análise.⁶⁶ Além disso, a técnica é capaz de extrair uma grande variedade de compostos orgânicos de diferentes polaridades, sendo que esses compostos podem ser armazenados por um certo tempo sem perda por decomposição. A técnica já foi utilizada para extração de ácidos graxos, ésteres,⁶⁸ álcoois aromáticos em cervejas.⁶⁹ Todavia, a SPE pode apresentar baixa seletividade.¹⁰

A extração sortiva em barra de agitação consiste no uso de uma barra de agitação magnética recoberta com uma fina camada polimérica⁶³ (usualmente é empregado o polidimetilsiloxano, PDMS, ou sua associação com o etilenoglicol, EG).¹⁰ Os analitos contidos na amostra ficam sorvidos no polímero, sendo posteriormente desorvidos em uma unidade térmica e direcionados à coluna cromatográfica de um GC.⁶³ A técnica apresenta alta sensibilidade, além de não necessitar do uso de solventes. Além disso, a maior espessura utilizada do PDMS, se comparada às espessuras utilizadas nas fibras de microextração em fase sólida, favorece uma maior pré-concentração de analitos, melhorando, por consequência,

o limite de detecção.⁶³ Entretanto, devido ao caráter pouco polar do PDMS, a eficiência é melhor para compostos de média a baixa polaridade,⁶⁴ tendo sido aplicada para análise de compostos sulfurosos, carbonílicos, terpenóides derivados do lúpulo e ésteres em cervejas.⁶³

Para uma melhor visualização das vantagens e desvantagens das técnicas de extração já mencionadas, no Quadro 5 estão mostrados alguns de seus aspectos.¹⁰

Quadro 5 – Características das diferentes técnicas de extração utilizadas em cervejas. O símbolo de “+” indica o nível associado entre a técnica e a respectiva característica (+ = baixa associação, ++ = associação intermediária, +++ = alta associação). A ausência do símbolo “+” indica que a relação entre a técnica e a característica citada não se aplica.

Características	Técnicas baseadas em solvente (LLE, SDE, SFE)	Headspace (DHS, SHS)	Técnicas sortivas		
			SPE	SBSE	SPME
Diferentes fases estacionárias			++	+	+++
Sensibilidade		++		+++	+++
Seletividade	+	+	+	+	+++
Facilidade no manuseio	+	++		++	+++
Durabilidade		+++		++	+
Tempo demandado	+++		++	+	+
Uso de solventes	+++		++		

Fonte: Adaptado de Martins (2018).

Com relação às técnicas de SPME e de headspace, usualmente utilizadas em conjunto (HS-SPME), que possuem inúmeras aplicações e vantagens na análise de voláteis em cervejas,⁷⁵⁻⁷⁸ as informações estão dispostas mais detalhadamente nas seções a seguir.

3.5. Microextração em fase sólida

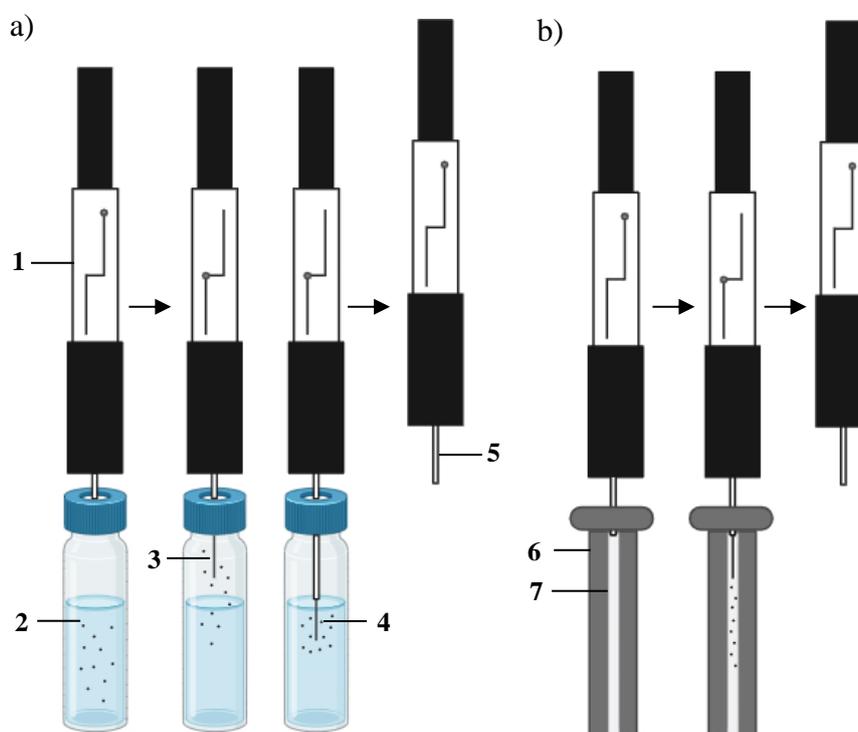
O desenvolvimento da microextração em fase sólida, realizada por Janusz Pawliszyn e colaboradores na década de 1990, foi importante para superar algumas das principais desvantagens da SPE.⁷¹ Embora a SPE apresentasse vantagens em comparação com a extração líquido-líquido, ainda havia limitações como a necessidade de várias etapas durante o processo de isolamento do analito, aumentando o tempo de análise, a baixa seletividade e a utilização de solventes.⁷² O advento da SPME eliminou ou, no mínimo, reduziu drasticamente a necessidade do uso de solventes e permitiu o acoplamento em cromatógrafos para a desorção dos analitos.⁷⁰

Para a realização da SPME é utilizada uma fibra flexível de sílica fundida revestida por uma fina camada de material polimérico ou de um sólido sorvente.⁷¹ A fibra é acoplada em um êmbolo e posicionada dentro um amostrador, também conhecido como *holder*, que

contém uma seringa. O uso do *holder* tem como objetivo proteger a fibra, que é frágil, e possibilitar a perfuração de septos de *vials* e de injetores de cromatógrafos.^{70,71}

O processo da SPME foi ilustrado na Figura 7a e se inicia a partir da introdução da amostra dentro de um *vial* de vidro, que é posteriormente fechado. Em seguida, é realizada a perfuração do septo do *vial*, utilizando-se a agulha do *holder*, e então a fibra pode ser exposta diretamente na amostra (imersão direta) ou no espaço vazio do *vial* (modo *headspace*).

Figura 7 – Processo de microextração em fase sólida nas etapas a) extração dos analitos contidos na amostra e b) dessorção dos analitos no injetor do cromatógrafo a gás. Os números indicam 1) seringa do *holder* perfurando o septo do *vial*, 2) o *vial* contendo a amostra e os analitos, 3) a fibra exposta em modo *headspace*, 4) a fibra exposta em modo imersão direta, 5) o *holder* retirado do sistema com a fibra retraída dentro da seringa, 6) o injetor do cromatógrafo e 7) o *liner*.



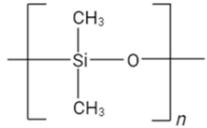
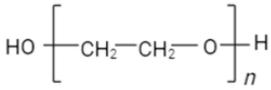
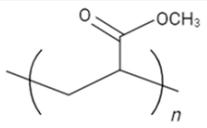
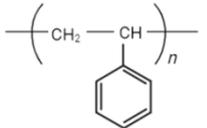
Fonte: Criado com *biorender.com*.

Após o processo, a fibra é retraída para o *holder*, que é retirado do *vial* e utilizado novamente para perfurar o septo do injetor do GC (Figura 7b). A fibra é então exposta dentro do *liner* do injetor, durante o tempo de dessorção, e os analitos sorvidos no recobrimento são liberados. A fibra é então retraída novamente e o *holder* retirado do injetor. Essas etapas podem ser realizadas manualmente ou por amostradores automáticos, acoplados a cromatógrafos a gás.

3.5.1.1. Materiais sorventes em SPME

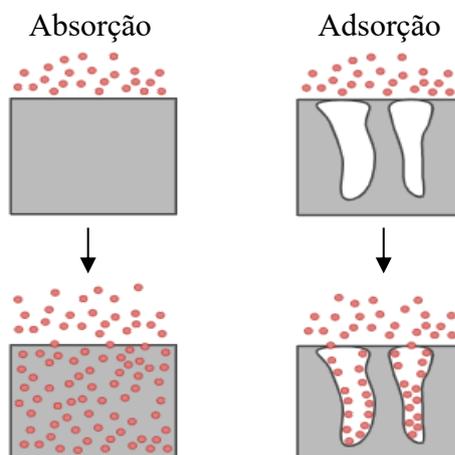
As fibras de SPME podem ser fabricadas utilizando-se diferentes tipos de revestimentos poliméricos, como mostrado no Quadro 6. Isso permite um maior número de possibilidades de escolha de materiais com afinidades similares aos dos compostos de interesse.⁷⁹

Quadro 6 – Polímeros comumente utilizados em SPME e estrutura de seus monômeros.

Polímero de recobrimento da fibra	Monômero ⁸⁰
Polidimetilsiloxano (PDMS)	
Polietilenoglicol (PEG)	
Poliacrilato (PA)	
Divinilbenzeno (DVB)	

Os revestimentos são considerados adsorventes ou absorventes. Revestimentos adsorventes apresentam uma superfície sólida e porosa, enquanto revestimentos absorventes são compostos por polímeros líquidos.⁸⁰ Na Figura 8 estão apresentados esquematicamente os processos de extração de analitos por absorção e adsorção, utilizando-se revestimentos líquidos e sólidos, respectivamente.⁸¹

Figura 8 – Mecanismos de extração para materiais utilizados como revestimentos de fibra SPME.



Fonte: Criado com *biorender.com*.

Por meio da Figura 8 é possível observar que em revestimentos sólidos o processo de adsorção ocorre por interações na superfície do revestimento, com a migração dos analitos para dentro dos poros. A eficácia desse processo vai depender da polaridade da fibra, do tamanho da cadeia carbônica do analito, do diâmetro do poro e do quão poroso é o material.⁸⁰

Em materiais líquidos, por sua vez, os analitos permeiam por entre o revestimento, sendo atraídos de acordo com a polaridade entre o analito e o material que compõe a fibra. Quanto mais parecidas as polaridades entre o material do revestimento e os analitos, maior a interação entre eles e, conseqüentemente, melhor será a extração.⁸⁰

A espessura do revestimento também influencia na eficácia da absorção, conforme o tamanho da cadeia carbônica dos analitos a serem extraídos. Para moléculas maiores, por exemplo, a migração por entre o revestimento líquido é mais lenta, facilitando a retenção desses compostos na fibra. No entanto, em se tratando de moléculas menores e que migram mais rapidamente, a retenção será menor, demandando o uso de uma fibra com revestimento mais espesso para a melhor absorção desses analitos.^{80,81}

Visto que o material utilizado no recobrimento e sua espessura influenciam na afinidade com os analitos, escolher a fibra mais adequada para a análise, considerando-se a natureza físico-química dos compostos de interesse, é importante para assegurar a eficácia da extração, garantir seletividade e reprodutibilidade nas análises.⁸² Para tanto, há comercialmente várias opções de fibras SPME, como apresentado no Quadro 7.^{81,83}

Quadro 7 – Fibras de SPME comercialmente disponíveis e suas aplicações.

Espessura e material* da fibra	Polaridade	Mecanismo de extração	Aplicações recomendadas	Faixa de massas moleculares (g mol ⁻¹)
100 µm PDMS	Não-polar	Absorvente	Voláteis	60-275
30 µm PDMS	Não-polar	Absorvente	Semivoláteis	80-500
7 µm PDMS	Não-polar	Absorvente	Compostos não-polares com alta massa molecular	125-600
60 µm PEG	Não-polar	Absorvente	Álcoois e compostos polares	40-275
85 µm PA	Polar	Absorvente	Semivoláteis polares	80-300
75 µm/85 µm CAR/PDMS	Polar	Adsorvente	Gases e compostos com baixa massa molecular	30-225
65 µm PDMS/DVB	Bipolar	Adsorvente	Voláteis, aminas e nitro-aromáticos	50-300
50/30 µm DVB/CAR/PDMS	Bipolar	Adsorvente	Voláteis e semivoláteis, compostos traço	40-275

*CAR: carboxeno.

Além das informações apresentadas no Quadro 7, existem faixas de pH e valores de temperatura recomendados para cada material de revestimento,⁸³ fatores que também devem ser consultados previamente à compra e uso da fibra.

Dentre as fibras com mecanismo de extração por absorção, tem-se o poliacrilato (PA), um polímero sintético obtido a partir da polimerização do monômero de acrilato de metila. Suas características são alta estabilidade térmica e alta resistência química.^{84,85}

Em comparação com outros tipos de revestimento, como o PDMS e o PEG, a migração de moléculas para dentro e fora do revestimento PA é um pouco mais lenta, visto que se trata de um polímero mais denso. No entanto, esta fase tem uma grande afinidade por compostos aromáticos e analitos oxigenados, o que permite as inúmeras possibilidades de aplicação.⁸⁰ Na literatura encontram-se registros do uso da fibra PA em análises de pesticidas,⁸⁶ na indústria do tabaco,⁸⁷ em alimentos⁸⁸ e para compostos voláteis presentes em bebidas,⁸⁹ como a cerveja^{7,90} e a cachaça.⁹¹

3.6. Extração por headspace

Como mencionado anteriormente, a SPME pode ser utilizada em modo *headspace*, uma forma de extração comumente aplicada para capturar compostos voláteis.⁷⁴ As vantagens da HS-SPME são a não utilização de solventes, a alta sensibilidade para compostos voláteis e semi-voláteis e, pelo fato da fibra não entrar em contato diretamente com a amostra, há uma preservação do revestimento da fibra de danos por interferências da matriz.¹⁰

Existem dois tipos de extração em *headspace*: a dinâmica (DHS) e a estática (SHS). Na extração dinâmica, também conhecida como “*purge and trap*”, um gás é conduzido através ou sobre a amostra, transportando os vapores da amostra para um sorvente. Na extração estática, que é o caso da HS-SPME, os vapores gerados no processo primeiramente atingem o equilíbrio e posteriormente são amostrados.⁷⁴

No que diz respeito a extração estática em *headspace*, os pesquisadores Kolb e Etre relacionaram a área cromatográfica (A) de um pico com a concentração do analito na fase vapor. Para tanto, dentro de um *vial* fechado os analitos passam da amostra líquida para o *headspace*, rompendo a “barreira” entre as fases, e assume-se que o sistema alcançou o equilíbrio. O analito volátil está, então, distribuído entre as fases gasosa ($A_{\text{Headspace}}$) e líquida (A_{Amostra}) e, neste caso, tem-se o coeficiente de partição $K_{H/A}$, mostrado na Equação 1.⁷⁴

$$K_{H/A} = \frac{[A_{\text{Headspace}}]}{[A_{\text{Amostra}}]} \quad \text{Eq. 1}$$

Além do coeficiente de partição $K_{H/A}$, também são consideradas a concentração inicial dos analitos na solução aquosa (C_o) e a razão de fase β (relação entre o volume do *headspace* e o volume da amostra líquida) para a obtenção da concentração do analito no *headspace* (C_H), por meio da Equação 2.⁷⁴

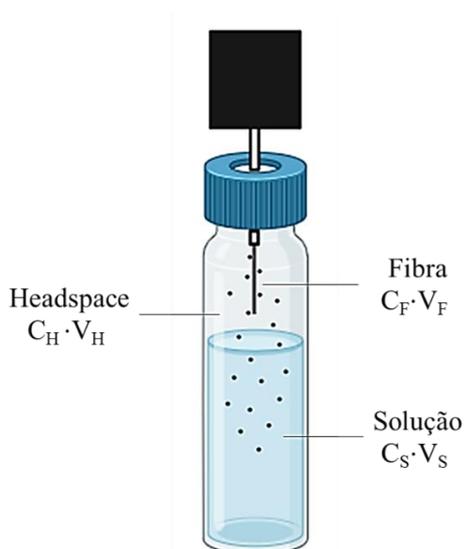
$$A \propto C_H = \frac{C_o}{K + \beta} \quad \text{Eq. 2}$$

Para a HS-SPME o equilíbrio de partição dos analitos e a cinética de transferência de massa entre fases abrange também o revestimento da fibra, além da fase líquida e o *headspace* anteriormente considerados nas equações da extração estática. Por meio da Equação 3, Pauliszyn e Zhang demonstraram a relação entre as três fases do sistema, levando-se em consideração a utilização de uma fibra de SPME com revestimento líquido.^{9,92} Esta equação se trata, na verdade, do balanço de massa do sistema, em que o número de mols total é igual a soma do número de mols de analito em cada fase do sistema.

$$C_o V_S = C_S \cdot V_S + C_H \cdot V_H + C_F \cdot V_F \quad \text{Eq. 3}$$

Como pode ser observado na Equação 3, C_o é a concentração inicial dos analitos na solução aquosa e C_F , C_S e C_H são as concentrações em equilíbrio dos analitos na fibra, em solução aquosa e no *headspace*. Além disso, V_S , V_F e V_H são os volumes da solução, do recobrimento da fibra e do *headspace*, respectivamente. Para uma melhor visualização, as fases do sistema são mostradas na Figura 9.

Figura 9 – Três fases do sistema HS-SPME que contemplam a solução, a fibra e o *headspace*.



Os coeficientes de partição $K_{H/S}$, entre o *headspace* e a amostra (Equação 4) e $K_{F/H}$, entre a fibra e o *headspace* (Equação 5) são também considerados.

$$K_{H/S} = \frac{C_H}{C_S} \quad \text{Eq. 4}$$

$$K_{F/H} = \frac{C_F}{C_H} \quad \text{Eq. 5}$$

Por fim, a quantidade (n) de analito sorvida por uma fibra de SPME com revestimento líquido foi obtida por meio da Equação 6.^{9,92} Em uma abordagem didática, Kolb e Etre demonstraram que n se relaciona com os coeficientes de partição da seguinte maneira (as manipulações matemáticas estão dispostas no Apêndice C):

$$n = \frac{C_o \cdot V_S \cdot V_F \cdot K_{F/H} \cdot K_{H/S}}{V_S + K_{H/S} \cdot V_H + V_F \cdot K_{F/H} \cdot K_{H/S}} \quad \text{Eq. 6}$$

A análise dos parâmetros envolvidos na cinética de transferência de massa entre fases da HS-SPME contribuiu para elucidar a importância do controle de algumas variáveis durante o processo de extração, na etapa de desenvolvimento do método, abordadas no tópico subsequente.

3.7. Parâmetros para o desenvolvimento do método HS-SPME

Na análise HS-SPME, além da etapa da escolha do material e da espessura da fibra, existem outros fatores que devem ser levados em consideração. Dentre eles, podem ser citados o volume de amostra, a temperatura e o tempo nas etapas de equilíbrio térmico e extração,⁷² o pH da amostra,²⁸ o uso de sal para promoção do efeito *salting out*,^{70,72} o uso de agitação, e o tempo de dessorção da fibra no injetor do GC.⁷⁰ Sendo assim, entender o impacto de cada variável na análise HS-SPME é essencial para realizar escolhas mais assertivas de cada parâmetro ao longo do processo e viabilizar melhores resultados.

O tempo e a temperatura são fatores importantes durante o HS-SPME. O tempo adequado é necessário para garantir a transferência dos voláteis por entre as fases na etapa de equilíbrio térmico, até que o sistema atinja o equilíbrio. Quando a fibra é exposta aos voláteis presentes no *headspace*, na etapa de extração, o tempo é uma das principais variáveis a serem otimizadas, sendo frequentemente um fator limitante na análise,⁸¹ uma vez que o processo é necessário para que ocorram as interações com a fibra e a pré-concentração dos analitos.

Aumentar a temperatura do sistema pode acarretar a redução do tempo necessário na análise, contribuindo para uma liberação mais eficiente de compostos da matriz (aumento de $K_{H/S}$).^{9,81} No entanto, o aumento da temperatura também pode resultar em perda de sensibilidade, devido à diminuição dos coeficientes de distribuição entre a fibra e o *headspace* ($K_{F/H}$, utilizado na Equação 5), reduzindo, por consequência, a concentração de voláteis absorvidos no revestimento.⁹² Portanto, selecionar o tempo e a temperatura de extração adequados para a análise HS-SPME é fazer uma conciliação entre os fatores tempo de preparo, sensibilidade e repetibilidade do método.⁸¹ O tempo necessário para atingir o equilíbrio também pode ser reduzido utilizando-se a agitação, tanto da fase aquosa quanto do *headspace*.⁹ Isso ocorre, pois a agitação do sistema acarreta o aumento da transferência de massa da amostra para a fase estacionária de uma fibra.⁸¹

O volume utilizado de amostra pode impactar em alguns fatores importantes na análise SPME. Um maior volume utilizado de amostra pode resultar em maior quantidade de analito extraído, o que pode melhorar a sensibilidade da análise, visto que a sensibilidade de um método é diretamente proporcional ao número de mols extraídos da amostra em equilíbrio.⁹³ Porém, um volume maior de amostra pode implicar também um maior tempo necessário para que os analitos sejam liberados da matriz para a fibra, implicando um maior tempo para o sistema atingir o equilíbrio e, por consequência, aumentando o tempo total de análise.

A adição de sal na matriz é importante para a ocorrência do efeito *salting-out*, em que a força iônica do meio é modificada e ocorre a redução da solubilidade de analitos de maior hidrofobicidade, facilitando a transferência dos analitos para o *headspace*. O ajuste do pH, por sua vez, pode influenciar na extração devido à conversão de espécies iônicas em espécies neutras, visto que apenas espécies neutras ou não dissociadas são suficientemente voláteis para estarem presentes no *headspace* e serem sorvidas pela fibra de SPME. Por fim, avaliar o tempo de dessorção é essencial para garantir que os analitos sejam completamente dessorvidos da fibra e evitar efeitos memória.⁸¹

3.8. Otimização multivariada

Ao serem realizados experimentos em laboratório, muitos fatores podem afetar diretamente os resultados, que variam de acordo com cada técnica utilizada. Para análises de cerveja por HS-SPME, por exemplo, em que a escolha dos fatores anteriormente mencionados pode impactar na eficácia da extração dos analitos, conduzir experimentos de maneira eficiente e sistemática contribui para uma maior assertividade dos resultados obtidos.

Nesse contexto, os chamados planejamentos de experimentais (do inglês DOE, *Design Of Experiments*) podem ser utilizados como método de otimização multivariada, que leva em consideração, além das variáveis, a contribuição das interações entre as variáveis envolvidas na análise.⁹⁴ Para tanto, inicialmente são escolhidos os fatores, que são as variáveis passíveis de serem controladas, e as respostas de interesse. A partir dessas informações, o tipo de planejamento experimental é definido de acordo com o objetivo pretendido e, então, são definidos os níveis dos fatores escolhidos, que podem ser valores, para fatores quantitativos, ou classes, no caso de fatores qualitativos.⁹⁵

Os planejamentos experimentais permitem otimizar processos e reduzir a quantidade de experimentos necessários para obter informações significativas, por meio da seleção cuidadosa de pontos de teste suficientes para uma compreensão abrangente das relações entre as variáveis. Também é possível determinar os fatores com impacto significativo para cada resposta específica, bem como avaliar as relações entre os fatores que impactam nas respostas. Além disso, permitem encontrar as condições ideais para a análise, por meio da identificação de combinações de variáveis que maximizam ou minimizam uma determinada resposta.⁹⁵

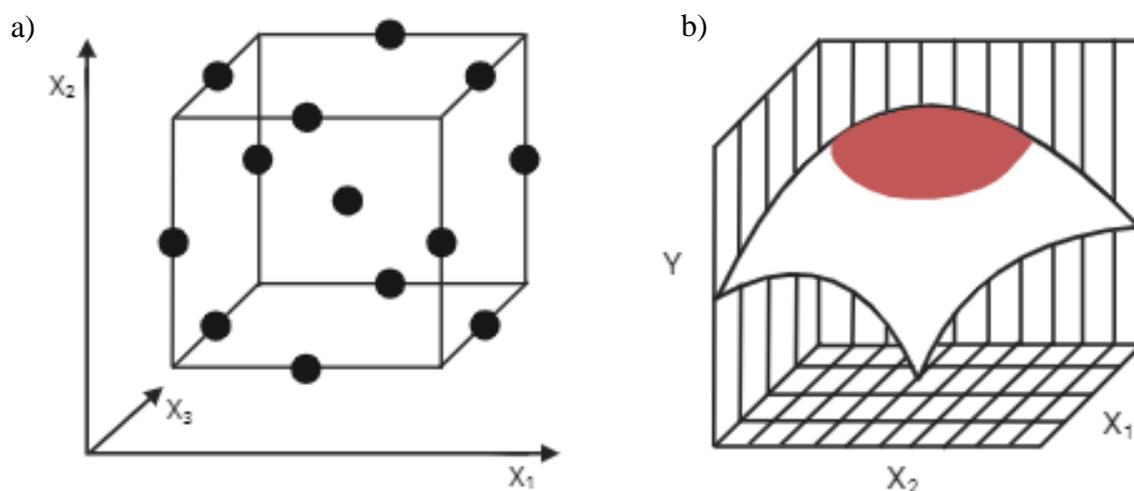
Desta forma, os planejamentos experimentais são ferramentas importantes para planejar experimentos de forma estratégica, analisar os dados de maneira eficiente e tomar decisões assertivas, já sendo aplicados anteriormente em trabalhos de análise de voláteis em cervejas.^{28,49,54} Dentre os planejamentos existentes, podem ser utilizados os fatoriais completos, os fracionários e os que incluem a metodologia de superfície de resposta, como exemplo o planejamento *Box-Behnken*.

3.8.1. Planejamento *Box-Behnken*

O planejamento *Box-Behnken* (BBD) foi criado com base no planejamento fatorial, enquadrando-se também na metodologia de superfície de resposta.⁹⁶ Segundo Ferreira e colaboradores (2007), este planejamento pode ser definido como uma classe de experimentos de segunda ordem rotativos ou quase rotativos baseados em experimentos fatoriais incompletos de três níveis.⁹⁴

Representando de forma gráfica, os experimentos do planejamento BBD compõem um cubo com um ponto central e pontos no centro de cada um dos vértices, como ilustrado na Figura 10a.⁹⁴ Após a realização dos experimentos e tratamento numérico dos resultados, obtém-se uma superfície de resposta, como representado na Figura 10b. Por meio dela, é possível visualmente observar padrões de mudança da resposta, à medida que os fatores variam, e pontos ou regiões de máximo e mínimo.⁹⁵

Figura 10 – Representação gráfica a) dos experimentos *Box-Behnken* ao longo do cubo e b) da superfície de resposta gerada com uma região (em vermelho) de respostas mais altas.



Fonte: Criado com *biorender.com* baseado em Ferreira et al. (2007); Neto, Scarminio e Bruns (2001).

Comparando-se com outros planejamentos de metodologia de superfície de resposta, como o planejamento de composto central (CCD), a eficiência do planejamento BBD é maior.⁹⁴ A eficiência leva em consideração a relação entre o número de coeficientes no modelo estimado (p) pelo número de experimentos necessários (f). Considerando-se um sistema com 3 fatores, tem-se que $p = 10$ e $f = 15$ para o CCD, com a eficiência de 0,67. Já em se tratando do BBD, $p = 10$ e $f = 13$, o que resulta na eficiência de 0,77.⁹⁵ No entanto, uma particularidade do BBD é o fato de não conter combinações nos extremos, ou seja, em que os fatores simultaneamente estão em seus níveis mais altos ou mais baixos. Isso deve ser levado em conta ao escolher esse tipo de experimento para uma determinada análise.⁹⁴

O planejamento BBD já foi utilizado para aplicações em metabolômica, como nos parâmetros de preparo de amostra, no desenvolvimento e validação dos métodos analíticos e na análise de dados.⁹⁶ Stefanuto e colaboradores (2017), por sua vez, utilizaram o planejamento BBD para a escolha de alguns parâmetros do método de um GC×GC-TOFMS para análises de cervejas artesanais do tipo Trapista, após realização de HS-SPME. Os parâmetros relacionados à segunda coluna do GC×GC, tais como temperatura da rampa de aquecimento, fluxo e *offset* de temperatura ²D foram estudados e otimizados.⁵⁴

Esse tipo de planejamento também foi aplicado em outras matrizes de bebidas alcoólicas fermentadas, mais especificamente hidromel e sidra, e determinação via cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC) por Resende e colaboradores (2019). Neste trabalho objetivou-se a otimização dos parâmetros de extração de ácidos graxos de cadeia

média via extração assistida por campo elétrico com os parâmetros otimizados tempo de extração (min), concentração de eletrólitos presentes no suporte sólido (mg L^{-1} de $\text{NH}_4\text{OH}:\text{NaOH}$) e potencial elétrico (V). Além de se obter os parâmetros ótimos para cada ácido graxo, também foi um obtido um parâmetro ótimo para o conjunto de analitos via uso da função desejabilidade.⁹⁷

3.9. Análise exploratória de dados

Ao se realizar experimentos em uma dada matriz, como a cerveja, podem ser obtidas diferentes relações entre as amostras e os analitos estudados, que podem se apresentar como padrões complexos e de difícil interpretação visual dos dados. Neste contexto, para facilitar a identificação de relações entre amostras, a análise exploratória de dados pode ser aplicada e trata-se de uma abordagem estatística que visa entender e visualizar padrões, tendências e relações presentes em conjuntos de dados complexos.⁹⁸ Para tanto, alguns métodos estatísticos multivariados de classificação são empregados, como a análise de componentes principais (PCA) e a análise hierárquica de agrupamentos (HCA).

3.9.1. Análise de componentes principais (PCA)

A PCA é um método de projeção que representa os dados originais em dimensões menores, reduzindo assim a dimensionalidade, obtendo um novo conjunto de variáveis, conhecidas como componentes principais (PC). Por meio da PCA são calculadas as correlações entre as colunas da matriz de dados e as variáveis são classificadas de acordo com os coeficientes de correlação obtidos.⁹⁹

A PCA é útil para identificar agrupamentos, tendências e anomalias nos dados, além de auxiliar na seleção de variáveis mais relevantes. Sua aplicação tem abrangido vários campos de pesquisa, incluindo a análise de bebidas alcoólicas.⁹⁹ Como exemplo, Jiao e colaboradores (2011) realizaram o estudo exploratório do perfil de voláteis em cervejas por HS-SPME-GC-FID e, por meio da análise PCA, foi possível agrupar as amostras nas categorias Chopp, Tradicional e Escura, bem como discerni-las de acordo com o tipo, cervejaria e especificação de cada amostra analisada. Além da PCA, também foi utilizada a HCA para compreender os agrupamentos entre as cervejas.¹⁰⁰

3.9.2. Análise hierárquica de agrupamentos (HCA)

A HCA é um método de agrupamento que organiza os dados com base em suas características, facilitando a interpretação e visualização de diferenças e similaridades. Por meio dela, é construída uma árvore hierárquica (dendrograma) em que os dados são

agrupados em diferentes níveis de semelhança, de forma que a homogeneidade ou heterogeneidade entre grupos é visualizada com base nas distâncias entre os agrupamentos.¹⁰¹ Assim como a PCA, a HCA é comumente aplicada em análises de cervejas,^{54,55,100} sendo um método importante para compreender as correlações entre as amostras e os compostos voláteis estudados.

4 METODOLOGIA

4.1. Preparo das soluções padrão

Inicialmente, com o intuito de identificar os tempos de retenção de cada analito a ser estudado, foram preparadas soluções estoque de concentração 1000 mg L⁻¹ em 40% v/v de etanol em água, a partir dos padrões analíticos de cada composto, com exceção dos padrões internos (PI). Utilizando-se as soluções estoque, foi criada uma solução intermediária de concentração 100 mg L⁻¹ em 5% v/v de etanol em água com a mistura dos analitos. Os reagentes utilizados e suas respectivas informações são apresentados no Quadro 8.

Quadro 8 – Reagentes utilizados para a realização das soluções.

Grupo Químico	Padrão Analítico	Marca	Lote	Pureza (%)
Álcoois	Álcool etílico	CRQ	R0401491000	99,8
	Álcool isoamílico	Sigma-Aldrich	72996DM	> 99
	1-hexanol	Sigma-Aldrich	STBJ3569	98
	Álcool β-fenetílico	Sigma-Aldrich	SHBN1845	> 99
	5-nonanol*	Sigma-Aldrich	BCBV5316	95
	n-butanol**	Sigma-Aldrich	SHBH1629V	> 99,9
Ésteres	Acetato de isoamila	Sigma-Aldrich	BCBC6337	> 99,9
	Octanoato de etila	Fluka	44999MJ	98
	Decanoato de etila	Sigma-Aldrich	STBH7203	> 99
	Acetato de 2-fenetila	Sigma-Aldrich	SHBN1845	> 99
	Ácido hexanóico	Sigma-Aldrich	WXBC9730V	> 98
	Ácido octanóico	Sigma-Aldrich	BCBC3344	> 99,5
	Ácido decanóico	Merk	SHBM8614	> 99,5
Terpeno	Linalol	Merk	SHBL2222	97

* Padrão interno utilizado para o planejamento experimental Box-Behnken

** Padrão interno utilizado para a HS-SPME das amostras de cerveja

Para os álcoois 5-nonanol e n-butanol, que foram utilizados como padrão interno nas análises executadas, foi utilizada a metodologia para análise de voláteis em cerveja da ASBC (Sociedade Americana de Químicos de Cerveja) que preconiza a criação da solução de padrão interno em concentração de 1000 ppm em solução etanólica (100%).¹⁰² Assim sendo, procedeu-se desta maneira para as soluções dos padrões internos. Por fim, as soluções foram armazenadas a temperatura de 4 °C até a próxima utilização, respeitando-se a validade de 30 dias para as soluções estoque e 7 dias para a solução intermediária.

4.2. Preparo das amostras de cerveja Pilsen

As amostras de cerveja Pilsen (n = 22) foram adquiridas no comércio local de Belo Horizonte e armazenadas em geladeira a 4 °C. Após a abertura do recipiente (lata ou garrafa), 250 mL de cerveja foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de capacidade 350 mL, com posterior adição de 5 gotas de simeticona 75 mg/mL (Cimed, lote 2017295), com intuito de desgaseificação e redução da espuma. Em seguida, os Erlenmeyers foram alocados em um mixer (BiomiXer, TS-2000A VDRL Shaker) e agitados por 15 minutos. As amostras desgaseificadas foram analisadas e posteriormente vertidas em frascos plásticos âmbar devidamente rotulados e fechados, sendo armazenadas a 4 °C. Ao todo, foram utilizadas 22 amostras, 11 industriais e 11 artesanais, e as informações pertinentes a cada uma estão dispostas no Quadro 9.

Quadro 9 – Cervejas Pilsen analisadas e suas respectivas informações.

Código	Categoria	Tipo informado na embalagem	Especificação	Teor Alcoólico informado (% v/v)
ART-TST	Artesanal	Pilsen Puro Malte	---	4,9
ART-A	Artesanal	Pilsen Puro Malte	---	4,8
ART-B	Artesanal	Pilsen Puro Malte	---	4,5
ART-C	Artesanal	Lager Puro Malte	---	4,8
ART-D	Artesanal	Pilsen Puro Malte	---	4,5
ART-E	Artesanal	Pilsen Puro Malte	---	4,5
ART-F	Artesanal	Lager Puro Malte	---	4,8
ART-G	Artesanal	Pilsen Puro Malte	Zero Álcool	0,3
ART-H	Artesanal	Pilsen Puro Malte	Low Carb	4,8
ART-I	Artesanal	Lager Puro Malte	Low Carb	4,5
ART-J	Artesanal	Pilsen Puro Malte	---	4,5
IND-A	Industrial	Pilsen Puro Malte	---	4,4
IND-B	Industrial	Pilsen Puro Malte	---	5,0
IND-C	Industrial	Pilsen Puro Malte	---	4,8
IND-D	Industrial	Pilsen Puro Malte	Zero Álcool	0,0
IND-E	Industrial	Pilsen Puro Malte	---	5,0
IND-F	Industrial	Pilsen Puro Malte	---	5,0
IND-G	Industrial	Lager Puro Malte	---	5,0
IND-H	Industrial	Pilsen Puro Malte	Low Carb	3,5
IND-I	Industrial	Belgium Puro Malte	---	5,0
IND-J	Industrial	Pilsen Puro malte	---	5,2
IND-K	Industrial	Pilsen Puro Malte	---	5,0

A amostra ART-TST foi utilizada para a realização de testes preliminares e para a execução dos experimentos BBD.

4.3. Otimização da separação cromatográfica

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás hifenado a um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo como detector e modelo Shimadzu QP-2010 Plus. As injeções foram realizadas manualmente no injetor contendo *liner* Shimadzu para SPME (95 mm de comprimento, 0,75 mm de diâmetro interno) em modo *splitless* com temperatura do injetor de 250 °C. Foi utilizada a coluna Perkin Elmer Elite Wax (30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme) com programação de temperatura.

4.3.1. Testes preliminares do método

Inicialmente, parâmetros da programação de aquecimento, como tempo, temperatura e tempo mantido em temperatura constante (*hold time*) foram avaliados a fim de intensificar o sinal dos analitos e sua separação cromatográfica. Para tanto, foram realizadas análises em SPME utilizando-se a amostra ART-TST com a adição de 100 µL da solução intermediária contendo a mistura de analitos. Os parâmetros da SPME na etapa de testes preliminares foram volume de amostra igual a 5 mL (vertido em *vial* de capacidade de 20 mL), tempos de equilíbrio térmico e de extração de 30 min, temperaturas de equilíbrio térmico e de extração iguais a 40 °C, 1,5 g de NaCl e 25 µL de 5-nonanol a 1000 ppm em solução etanólica (100%). Esses valores foram baseados nos trabalhos de Li e colaboradores (2015) e León (2020) que realizaram a análise de cervejas por HS-SPME utilizando a fibra PA.^{7,103}

4.3.2. Condições cromatográficas otimizadas

No método otimizado, a temperatura inicial do forno foi mantida a 31 °C por 5 min, com rampa de aquecimento a uma taxa de 15 °C/min até 150 °C, mantendo-se por 2 min. Em seguida, utilizando-se a mesma taxa, aumentou-se a temperatura até 220 °C, que foi mantida por 5 min. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 25 min. Com relação ao gás de arraste, foi utilizado Hélio (He) de alta pureza (grau premier, 99,99 %) a uma pressão de 15,1 kPa e fluxo total de 11,5 mL/min, fluxo na coluna de 1,42 mL/min e velocidade linear de 42,7 cm/s.

A respeito dos parâmetros do espectrômetro de massas, a temperatura da fonte de íons foi de 220 °C e a detecção dos compostos foi realizada utilizando ionização por impacto de elétrons a 70 eV no modo de varredura *scan* com faixa de 25 a 200 *m/z*. O tempo para

acionamento do detector foi de 3 min após a injeção, para evitar a saturação devido à presença abundante de etanol nas amostras. Além disso, ao longo da corrida cromatográfica o ganho do detector teve que ser reduzido para evitar sua saturação em relação a alguns outros analitos com picos mais abundantes. Assim, nos intervalos entre 13 e 13,6 min, 14 e 15 min, e 17 a 19 min o ganho foi reduzido para 0,8, sendo restabelecido para 1,0 nos outros intervalos.

Para a determinação dos tempos de retenção dos analitos foi utilizado o *software* Shimadzu GCMS Browser e a biblioteca NIST do espectrômetro de massas. Para a obtenção das áreas dos analitos, foram utilizadas as razões m/z dos picos bases de cada analito. As proporções das razões m/z de fragmentos com menor intensidade em relação ao pico base também foram avaliadas para confirmar o pico relativo a cada analito e os analitos apresentaram similaridade acima de 90 na biblioteca NIST. As informações relativas a cada analito estão dispostas no Quadro 10.

Quadro 10 – Razões m/z utilizadas para obtenção das áreas e confirmação dos picos de cada analito.

Grupo Químico	Padrão Analítico	Pico Base (m/z) Quantificador	Íons menos abundantes (% m/z em relação ao pico base) Qualificadores
Álcoois	Álcool isoamílico	55	42 (90%), 31 (62%), 39 (45%), 57 (35%)
	1-hexanol	56	43 (82%), 55 (58%), 42 (56%), 31 (55%)
	Álcool β -fenetílico	91	122 (22%), 65 (22%), 39 (15%), 51 (13%)
	5-nonanol	69	87 (48%), 41 (41%), 27 (17%), 55 (17%)
	n-butanol	56	31 (98%), 27 (57%), 55 (30%), 39 (25%)
Ésteres	Acetato de etila	43	70 (62%), 61 (18%), 87 (16%), 73 (10%)
	Octanoato de etila	88	101 (38%), 57 (28%), 127 (25%), 29 (22%)
	Decanoato de etila	88	101 (42%), 43 (25%), 73 (19%), 155 (18%)
	Acetato de 2-fenetila	104	91 (18%), 105 (15%), 65 (12%), 77 (10%)
Ácidos	Ácido hexanoico	60	73 (44%), 41 (20%), 87 (16%), 45 (15%)
	Ácido octanoico	60	73 (62%), 43 (42%), 55 (58%), 101 (22%)
	Ácido decanoico	60	73 (90%), 41 (48%), 57 (42%), 129 (38%)
Terpeno	Linalol	71	93 (78%), 55 (65%), 43 (60%), 69 (44%)

Para as amostras, as áreas obtidas foram corrigidas com a utilização do padrão interno (relação área analito/área padrão interno).

4.4. Execução da microextração em fase sólida em modo headspace

4.4.1. Preparo dos vials

Para a realização da HS-SPME foram utilizados frascos de vidro transparentes (*vials*) de borossilicato com capacidade de 20 mL e tampa rosqueável metálica, contendo septo de

politetrafluoroetileno (PTFE/silicone). Previamente às análises, as massas de NaCl foram medidas em balança analítica (Metler, AE260) e, com o auxílio de barco de pesagem de vidro e espátula metálica, transferidas para seus respectivos *vials*.

4.4.2. Condicionamento da fibra

Foi utilizada a fibra de SPME de poliacrilato (PA) de 85 μm de espessura (Supelco). Para cada dia de análise, a fibra foi exposta inicialmente no injetor do GC-MS a 250 °C por 15 minutos, a fim de que houvesse dessorção, limpeza e condicionamento prévio, evitando possíveis efeitos memória de experimentos anteriormente realizados. Durante a dessorção inicial da fibra, foi realizada a corrida cromatográfica utilizando-se o mesmo método cromatográfico otimizado aplicado para as amostras, de modo que qualquer impureza percorresse a coluna e fosse identificada no cromatograma.

4.4.3. Execução da extração

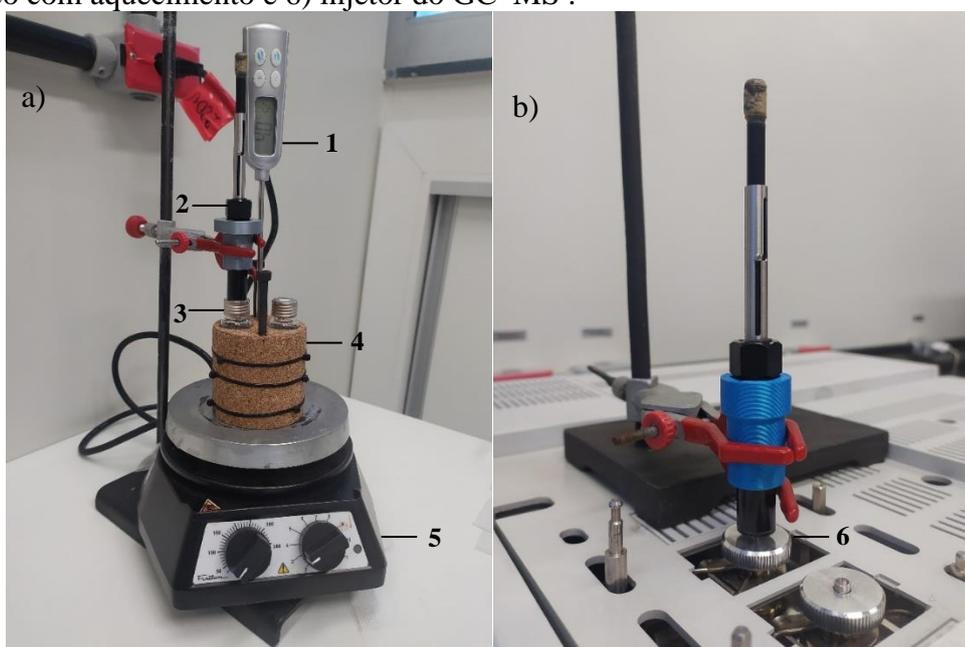
Para a realização da HS-SPME, o aparato necessário foi inicialmente montado. A priori, um cilindro de alumínio usado como bloco de aquecimento para até dois vials. Esse bloco foi isolado termicamente com uma membrana de cortiça, e durante as extrações era termostaticado, sendo colocado sobre um agitador magnético com aquecimento (Fisatom, E25, série 2180301). Após a configuração dos parâmetros de temperatura e agitação, um termômetro digital (Incoterm AF1604, exatidão de ± 1 °C) foi inserido em um orifício existente no bloco metálico e, após alcançada a estabilização da temperatura desejada, o experimento foi iniciado com o aparato montado como mostrado na Figura 11a.

Utilizando-se uma micropipeta de capacidade 1-10 mL, a amostra foi coletada e transferida para o *vial* contendo NaCl. Em seguida, com o auxílio de uma micropipeta de capacidade 10-100 μL coletou-se o volume de padrão interno e transferiu-se para dentro do *vial* contendo a amostra. Por fim, uma barra magnética (3 x 7 mm) foi inserida dentro do *vial*, que foi vedado com a tampa rosqueável. O *vial* foi, então, inserido na abertura presente no bloco de aquecimento e mantido em aquecimento e agitação durante o período de equilíbrio térmico.

Findado o tempo de equilíbrio, a seringa do *holder* de SPME foi inserida dentro do *vial*, a partir da perfuração do septo contido na tampa. Cuidadosamente, a fibra foi exposta em modo *headspace* e mantida nesta posição até a finalização do tempo de extração (Figura 11a). Um suporte universal foi utilizado para manter o sistema *holder*-fibra em posição vertical de forma estática e estável. Após o tempo de extração, recolheu-se a fibra no *holder*, que foi a

seguir retirado do *vial* e rapidamente transportado para o injetor do GC–MS . Manualmente, o *holder* foi inserido no injetor para dessorção dos analitos (Figura 11b). Nesta etapa, também foi utilizado um suporte universal para manutenção do posicionamento correto da fibra. Após o tempo de dessorção, a fibra foi recolhida no *holder* de SPME, que por sua vez foi retirado do injetor e utilizado para a análise consecutiva.

Figura 11 – Imagens da extração por HS-SPME com a) o aparato montado e b) durante a dessorção dos analitos. Os números indicam 1) termômetro, 2) *holder* de SPME, 3) *vial* contendo a amostra, 4) bloco de aquecimento envolto por membrana de cortiça, 5) agitador magnético com aquecimento e 6) injetor do GC–MS .



4.4.4. Otimização do tempo de dessorção da fibra

Com o intuito de estudar o tempo de dessorção da fibra PA no injetor do GC foram realizados testes em três diferentes amostras de cerveja (ART-A, IND-C, IND-H) utilizando os mesmos parâmetros da HS-SPME aplicados para a análise preliminar do método cromatográfico. Neste caso, foram avaliados os coeficientes de variação (CV) entre as replicatas ($n = 2$) das amostras para os tempos de 5 e 15 min de dessorção. O CV foi calculado a partir da divisão entre desvio padrão da área corrigida de cada analito e a média das áreas corrigidas entre as replicatas.

Os brancos de amostra também foram avaliados, com o intuito de verificar a existência de efeito memória dos analitos sorvidos na fibra. Para os brancos de amostra, foram vertidos 5 mL de uma solução de etanol 5% v/v¹⁰² em água dentro do *vial* com posterior adição de 1,5 g de NaCl. As condições da HS-SPME utilizadas para os brancos foram as mesmas para

as amostras. Além disso, para ambos foram utilizadas as condições otimizadas do método cromatográfico.

Por fim, também foram realizados brancos instrumentais, com a realização da corrida cromatográfica sem a injeção de nenhuma amostra, para averiguação da existência de possíveis impurezas provenientes da coluna.

4.4.5. Avaliação da variação entre as replicatas das cervejas Pilsen

Além dos testes preliminares de dessorção da fibra PA, os coeficientes de variação também foram avaliados ao longo das análises das amostras tendo em vista as possíveis diferenças nas matrizes das cervejas Pilsen artesanais e industriais. O objetivo dessa avaliação foi compreender se a variação nos resultados dos analitos entre amostras diferentes apresentaria um perfil similar ou distinto perante as condições cromatográficas e de extração otimizadas.

4.5. Otimização multivariada da HS-SPME por planejamento Box-Behnken (BBD)

Com o intuito de avaliar de forma multivariada os principais parâmetros experimentais para a HS-SPME foi utilizado o planejamento de superfície de resposta BBD. Para a realização do planejamento BBD, foram estipulados fatores e seus respectivos níveis, levando-se em consideração o estudo prévio da literatura para análises de voláteis em cervejas utilizando-se HS-SPME como método de pré-concentração.^{7,44,73,104-106} Os fatores escolhidos foram temperatura de extração, tempo de extração e volume de amostra. Os níveis baixos e altos estipulados foram de 20 e 40 minutos para o tempo de extração, 40 °C e 80 °C para a temperatura de extração, e 2 mL e 6 mL para volume de amostra. Os pontos centrais, por sua vez, foram definidos como a média dos valores para os níveis altos e baixos previamente escolhidos. As variáveis escolhidas e seus respectivos valores estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores estipulados para variáveis e níveis do planejamento BBD.

Fatores	Níveis		
	(-)	0	(+)
Tempo (min)	20	30	40
Temperatura (°C)	40	60	80
Volume de amostra (mL)	2	4	6

Além dos dados mostrados na Tabela 1, outros fatores foram considerados, sendo mantidos constantes durante execução do planejamento experimental. Para promoção do efeito *salting out* foi utilizado o sal cloreto de sódio (NaCl, Fluka, lote H3030, pureza maior

do que 99,5%) a 30% m/v em relação ao volume de amostra, proporção utilizada em estudos prévios^{7,105,107}. A quantidade de PI, por sua vez, foi estipulada em 2% v/v em relação ao volume utilizado de amostra. Além disso, foi mantida uma agitação do sistema a 450 rpm em todos os experimentos realizados.

Após definidas as variáveis e os níveis, um total de 15 experimentos foram executados em ordem aleatória, com triplicata no ponto central, utilizando-se a cerveja ART-TST como amostra e 5-nonanol como PI. Na Tabela 2 estão apresentados os experimentos executados e suas respectivas informações. Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o *software Statistica* versão 10 (*StatSoft*®, Estados Unidos da América).

Tabela 2 – Experimentos realizados no planejamento BBD.

Experimento	Fatores		
	Temperatura de extração (°C)	Tempo de extração (min)	Volume amostra (mL)
1	40	20	4
2	40	40	4
3	80	20	4
4	80	40	4
5	60	20	2
6	60	40	2
7	60	20	6
8	60	40	6
9	40	30	2
10	80	30	2
11	40	30	6
12	80	30	6
13	60	30	4
14	60	30	4
15	60	30	4

4.6. Análises multivariadas

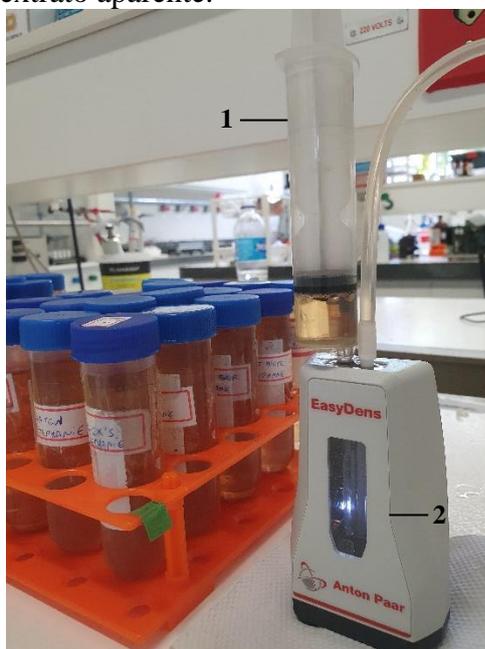
A análise PCA foi realizada utilizando-se *software* Chemoface (Cleiton Nunes, <https://www.ufpa.br/chemoface/>), com realização inicial de autoescalamento dos dados, sem remoção de *outliers*. O autoescalamento foi utilizado com o intuito de que todas as variáveis tivessem o mesmo peso estatístico. A HCA foi realizada empregando o mesmo *software*, utilizando-se as duas componentes principais da PCA e a distância euclidiana para obtenção do gráfico dendrograma.

4.7. Análises físico-químicas

4.7.1. Extrato aparente

Para a medição da densidade das amostras de cerveja foi utilizado um densímetro digital Easy Dens (Anton-Paar, Áustria) em conjunto com o aplicativo *Brew Meister*. Inicialmente, o densímetro foi lavado internamente com água destilada e calibrado com esse solvente. Em seguida, aproximadamente 2 mL de amostra foram coletados, com o auxílio de uma seringa de plástico, e injetados manualmente na entrada presente no equipamento, como é mostrado na Figura 12.

Figura 12 – Inserção da amostra de cerveja, com o auxílio de uma seringa (1) no densímetro digital (2) para medição do extrato aparente.



Após a inserção da amostra, foi realizada a medição das amostras e os valores médios disponibilizados pelo equipamento em graus Plato (P°). Para a conversão dessa unidade em unidade de densidade, a Equação 7 foi utilizada, em que a medida obtida foi multiplicada por quatro e somada à densidade da água (1 g/mL).

$$\text{Densidade (g/mL)} = 4 * (\text{medida da amostra em } ^\circ\text{P}) + 1 \quad \text{Eq. 7}$$

4.7.2. Teor alcoólico

O teor alcoólico foi validado de acordo com método proposto por Costa Fulgêncio e colaboradores (2022). Para tanto, em um tubo Eppendorf de capacidade 1,0 mL, foram transferidos 450 μL de uma solução de n-butanol 1% v/v (PI) previamente preparada no

laboratório e 50 µL de amostra. O sistema foi fechado e homogeneizado manualmente. Esses procedimentos também foram realizados para uma amostra de referência, com teor alcóolico de 5,1%.¹⁰⁸

A posteriori, com o auxílio de uma microseringa, 1 µL da solução foi injetado no GC-FID 17-A (Shimadzu) equipado com coluna Poraplot Q (Varian) de 10 m de comprimento e 0,32 mm de diâmetro interno. As temperaturas do injetor e detector foram configuradas para 200 °C e a análise foi realizada em modo isotérmico, com temperatura mantida a 180 °C por 5 minutos. O fluxo total do equipamento foi definido em 7 mL/min e a pressão a 24 mmHg. A velocidade do gás na coluna foi mantida a 63 cm/s, o SPL-R a 2 e o CFLW a 2,3.¹⁰⁸

Para a obtenção dos dados do GC-FID foi utilizado o *software* DMM Application (KYORITSU, Japão) e para a medição da área do pico do etanol e do padrão interno, foi utilizado o *software* CHROMuLAN (PiKRON, República Tcheca). Para o cálculo dos resultados, realizou-se a razão entre a área obtida para o pico do etanol e do PI n-butanol de cada cromatograma obtido. Essas razões foram comparadas proporcionalmente à razão obtida para a amostra de referência.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Otimização da separação cromatográfica

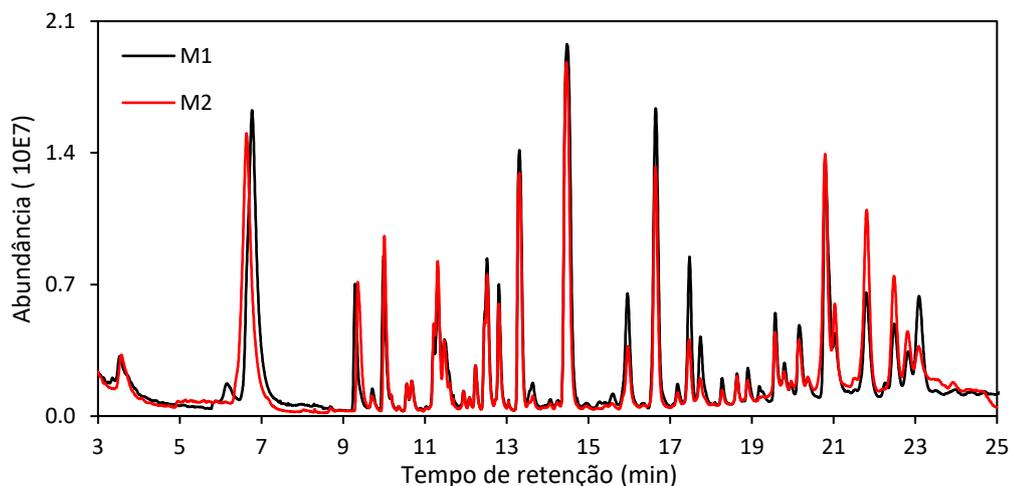
Inicialmente, alguns testes foram realizados em relação à programação de temperatura do forno, com o intuito de otimizar o método cromatográfico para obtenção de melhor resolução entre os picos e um tempo de análise adequado. As condições dos métodos criados, denominados M1, M2 e M3, estão mostradas no Quadro 11.

Quadro 11 – Condições utilizadas nos testes para otimização do método cromatográfico.

Método	Taxa (°C/min)	Temperatura final (°C)	Tempo em temperatura constante (<i>hold time</i> , min)
M1	-	30	10
	15	150	2
	15	210	5
M2	-	30	5
	15	150	2
	15	210	10
M3	-	31	5
	15	150	2
	15	220	5

Os cromatogramas de íons totais (TIC) obtidos estão mostrados na Figura 13. As condições experimentais foram definidas com o objetivo de alcançar um método célere em que fosse possível obter resolução suficiente para a determinação dos compostos de interesse.

Figura 13 – Cromatogramas de íons totais dos testes realizados para a otimização da separação cromatográfica.

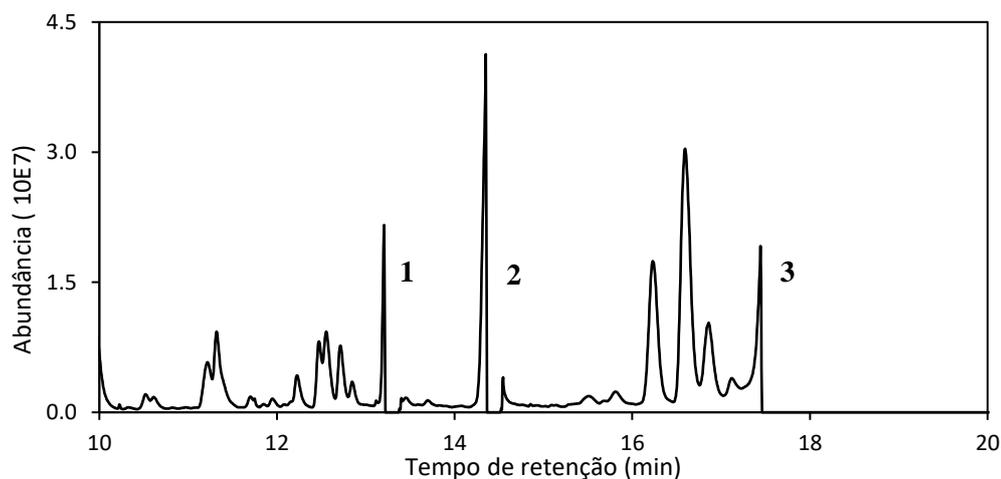


A diferença entre os métodos M1 e M2 foi em relação a temperatura do *hold time*, sendo maior antes da primeira rampa no método M1 e após a segunda rampa para o método

M2. Observou-se um perfil similar entre os cromatogramas obtidos, com presença de vários picos cromatográficos e uma pequena região de coeluição, no intervalo entre 11 e 12 min. As rampas de temperatura em ambos os métodos foram mantidas até esse intervalo, como uma tentativa de melhorar a separação desses compostos.

Ainda na etapa de testes, nos primeiros experimentos do planejamento BBD utilizando o método M3, em que foi empregado 5 min de *hold time* após as rampas, percebeu-se que em alguns momentos ocorreu saturação do detector, devido à alta abundância de alguns analitos. Nos pontos de saturação houve o desligamento automático do detector, fazendo com que os picos aparecessem cortados nos cromatogramas. Essas saturações ocorreram por volta de 13 min para o álcool β -fenetílico, 14 min para o ácido octanoico e aos 17 min, para alguns compostos liberados pela fibra, como o ftalato de dietila. Os pontos de saturação podem ser observados no cromatograma mostrado na Figura 14.

Figura 14 – Cromatogramas de íons totais dos pontos de saturação do detector observados ao longo da corrida cromatográfica para os analitos 1) álcool β -fenetílico, 2) ácido octanoico e 3) ftalato de dietila.



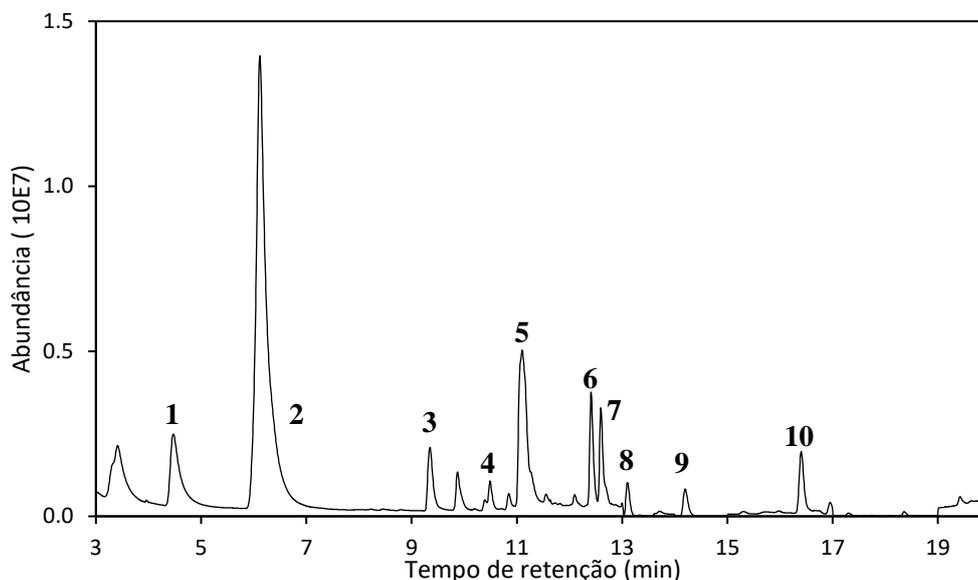
Desta forma, o método foi modificado com a redução do ganho do detector para 0,8 durante esses intervalos, como mostrado na Tabela 3, de forma a evitar a saturação.

Tabela 3 – Redução do fator de ganho do detector nos intervalos de saturação.

Intervalo (min)	Fator de ganho do detector
13,0	0,8
13,6	1,0
14,0	0,8
15,0	1,0
17,0	0,8
19,0	1,0

Após realizada a otimização, o método M3 foi utilizado para obter os resultados na amostra ART-C com os mesmos parâmetros da HS-SPME utilizados anteriormente para os testes com a ART-TST. Neste caso, porém, o PI utilizado foi n-butanol e não foi adicionada a solução padrão intermediária. O intuito foi observar a aplicação do método otimizado em uma amostra real. Por meio da Figura 15 é mostrado o cromatograma obtido.

Figura 15 – Cromatograma da amostra ART-C utilizando método otimizado M3 com identificação dos analitos 1) n-butanol (padrão interno), 2) álcool isoamílico, 3) octanoato de etila, 4) linalol, 5) decanoato de etila, 6) acetato de 2-fenetila, 7) ácido hexanoico, 8) álcool β -fenetílico, 9) ácido octanoico e 10) ácido decanoico.

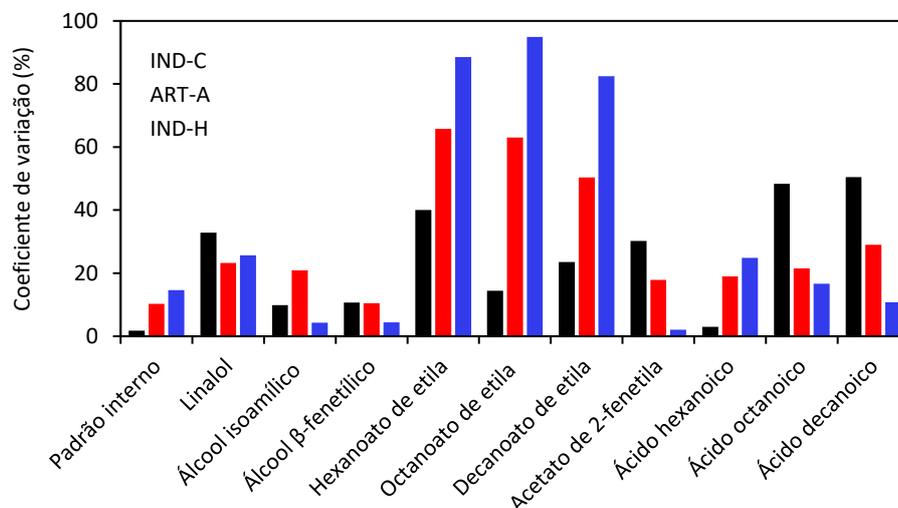


Embora a fibra PA apresente uma dessorção mais lenta dos compostos, que pode resultar em picos mais largos, se comparada a fibras mistas,²⁸ o método otimizado M3 foi satisfatório para a identificação dos picos de interesse e obtenção de suas respectivas áreas.

5.2. Otimização do tempo de dessorção da fibra

As análises preliminares em relação à dessorção da fibra foram iniciadas com o tempo de 5 min, período também utilizado por outros trabalhos em que foram conduzidas análises de cerveja por HS-SPME.^{49,105,106} No entanto, foram obtidos altos coeficientes de variação entre as replicatas, com valores que variavam de analito para analito e também entre as amostras. Para uma visualização desses valores, foi plotado o gráfico apresentado na Figura 16, em que três amostras de cervejas distintas foram analisadas.

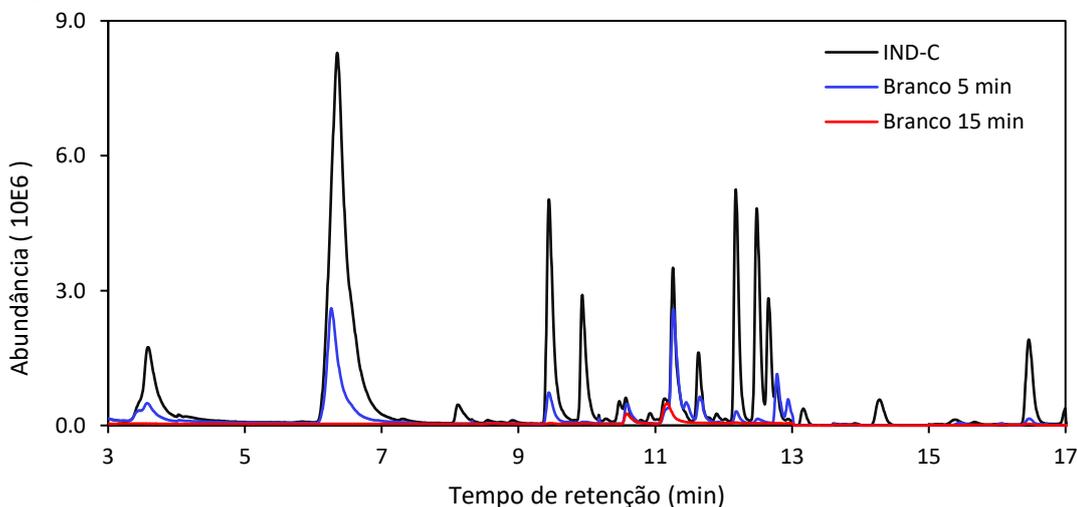
Figura 16 – Coeficientes de variação dos analitos avaliados em replicatas da análise (n = 2) de três diferentes amostras de cerveja empregando tempo de dessorção de 5 minutos.



A alta variabilidade nos dados em um experimento pode ser advinda de erros durante o preparo da amostra, falta de controle das condições do processo, falta de treinamento operacional, e falta de calibração de instrumentos. Mais especificamente, se tratando de SPME, o tempo de dessorção é um dos fatores importantes a serem verificados, para garantir a completa dessorção dos analitos e também de concomitantes, além da liberação dos sítios de reação para as análises posteriores.⁸¹

Reportando-se à literatura, foram encontrados trabalhos abrangendo o perfil de voláteis em cervejas por HS-SPME que utilizavam o tempo de 15 minutos para a dessorção da fibra.^{73,109,110} Assim, foram realizados testes para averiguar se esse tempo seria suficiente para a completa dessorção dos analitos. Os resultados obtidos foram plotados nos cromatogramas mostrados na Figura 17.

Figura 17 – Cromatogramas de íons totais da amostra IND-C e dos brancos com a utilização do tempo de dessorção da fibra de 5 e 15 min.

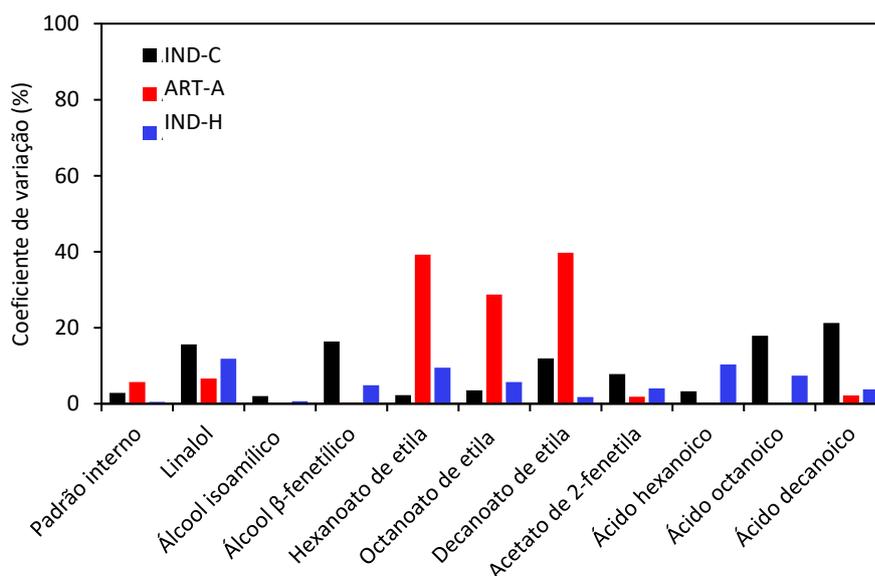


Por meio da Figura 17 pode ser observado que o branco analisado logo após a amostra IND-C que foi dessorvida por 5 minutos no injetor do cromatógrafo apresentou diversos picos relativos aos analitos da IND-C. Porém, quando foi realizada a análise de um branco com tempo de dessorção da fibra por 15 minutos, percebeu-se que quase nenhum pico foi observado, o que indica que o maior tempo da fibra no injetor permitiu a dessorção eficaz dos analitos. Para ambos os testes, os brancos instrumentais apresentaram apenas ruídos nos cromatogramas, de abundância máxima na ordem de $2,0E4$, contendo poucos picos relativos a analitos da própria coluna, contribuindo para descartar a hipótese de possível contaminação da coluna.

Na busca literária por parâmetros de dessorção, um ponto em comum encontrado para as análises de cerveja por HS-SPME foi a utilização de n-butanol como padrão interno, composto também utilizado pela ASBC no método recomendado para análise de voláteis em cervejas.¹⁰² Portanto, decidiu-se seguir para as análises de amostras utilizando este padrão interno e o tempo de dessorção de 15 min.

Assim, novas alíquotas das amostras de cervejas analisadas anteriormente foram analisadas novamente em replicata, com tempo de dessorção de 15 min e n-butanol como padrão interno. Os coeficientes de variação das duplicatas em relação aos analitos foram plotados no gráfico mostrado na Figura 18.

Figura 18 – Gráfico de variação dos analitos avaliados em replicatas da análise ($n = 2$) de três diferentes amostras de cerveja empregando tempo de dessorção de 15 minutos.



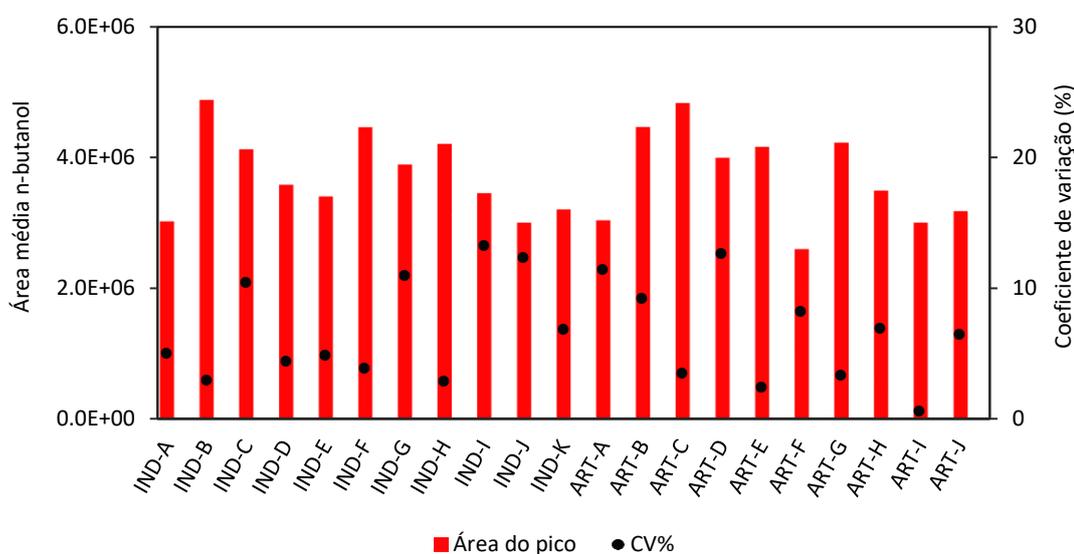
Na Figura 18 observou-se que, embora alguns analitos ainda apresentaram coeficientes de variação próximos a 40%, de modo geral houve uma grande redução nos coeficientes de

variação obtidos quando foi utilizado o tempo de dessorção de 15 min, em relação ao observado anteriormente na Figura 16. Desta forma, a otimização do tempo de dessorção foi eficaz para liberar os analitos sorvidos na fibra e reduzir o efeito memória, garantindo uma menor variabilidade nas áreas de cada analito e tornando o método mais robusto.

5.3. Avaliação da variação entre as replicatas das cervejas Pilsen

Além da variação observada durante a otimização do tempo de dessorção, ainda foram observadas variações entre replicatas ao longo das análises das cervejas Pilsen. Desta forma, inicialmente foi avaliado o comportamento do PI n-butanol com relação às áreas e ao coeficiente de variação entre as replicatas, como representado na Figura 19.

Figura 19 – Áreas médias do padrão interno n-butanol detectadas para as amostras de cerveja Pilsen industriais (sigla IND) e artesanais (sigla ART), representadas por barras, e os respectivos coeficientes de variação (CV%) entre replicatas (n = 2), representados por pontos.



Observando-se a Figura 19, percebeu-se que houve variação tanto nas áreas dos picos, entre uma análise e outra, bem como nos coeficientes de variação entre as replicatas de cada amostra. Com isso, mesmo tendo-se o controle minucioso dos parâmetros que envolvem a HS-SPME ainda havia fatores causadores de variação.

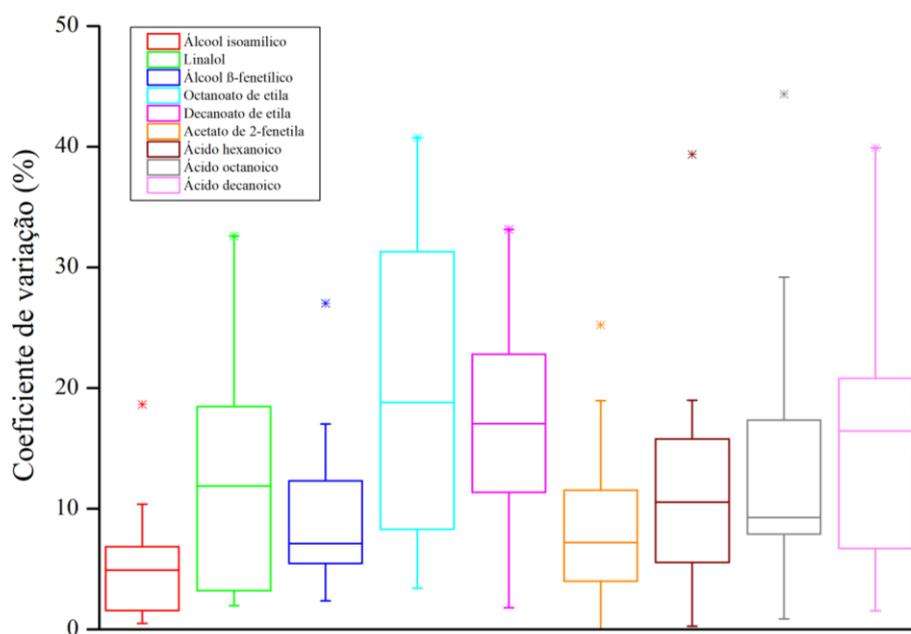
Mesmo que a fibra não esteja em contato direto com a amostra, um desses fatores é o efeito de matriz, já reportado na literatura em análises de HS-SPME para diferentes matrizes.^{77,111,112} A matriz não-volátil influencia em como os compostos são distribuídos entre o *headspace* e a amostra (coeficiente de partição $K_{H/A}$), sendo essa distribuição influenciada pelas propriedades químicas de cada analito e pelas interações que estabelecem com a matriz.⁷⁷ Outro fator é o tipo de fibra de SPME utilizada. A interação entre analito e fibra depende da polaridade do revestimento e o mecanismo de extração, por exemplo. Em virtude

disso, comumente são utilizados revestimentos mistos, como o DVB/CAR/PDMS, para extração de analitos que possuem diferentes características físico-químicas.¹¹³

Com o intuito de minimizar os efeitos causadores de variabilidade, o padrão interno tem sido a forma mais simples utilizada em trabalhos de análise de cerveja. Em grande parte desses trabalhos fez-se uso de fibras de SPME com revestimentos mistos, sendo alcançadas baixas variabilidades entre amostras.^{7,44,73,104-106} Vale ressaltar que nesses trabalhos também foram utilizados amostradores automáticos que, quando funcionando devidamente, contribuem efetivamente para a redução de erros não-sistemáticos.

No presente trabalho foram obtidos diferentes coeficientes de variação, comumente com valores mais altos, ao longo da análise das replicatas das amostras. Para uma observação visual desses resultados, foram plotados gráficos *boxplot* para cada analito, mostrados na Figura 20. Por meio dela, pode-se visualizar que as variações se distinguiram dentre os analitos, sendo menores para os álcoois.

Figura 20 – Gráfico *Boxplots* dos coeficientes de variação entre réplicas para cada analito dentre as cervejas Pilsen analisadas.



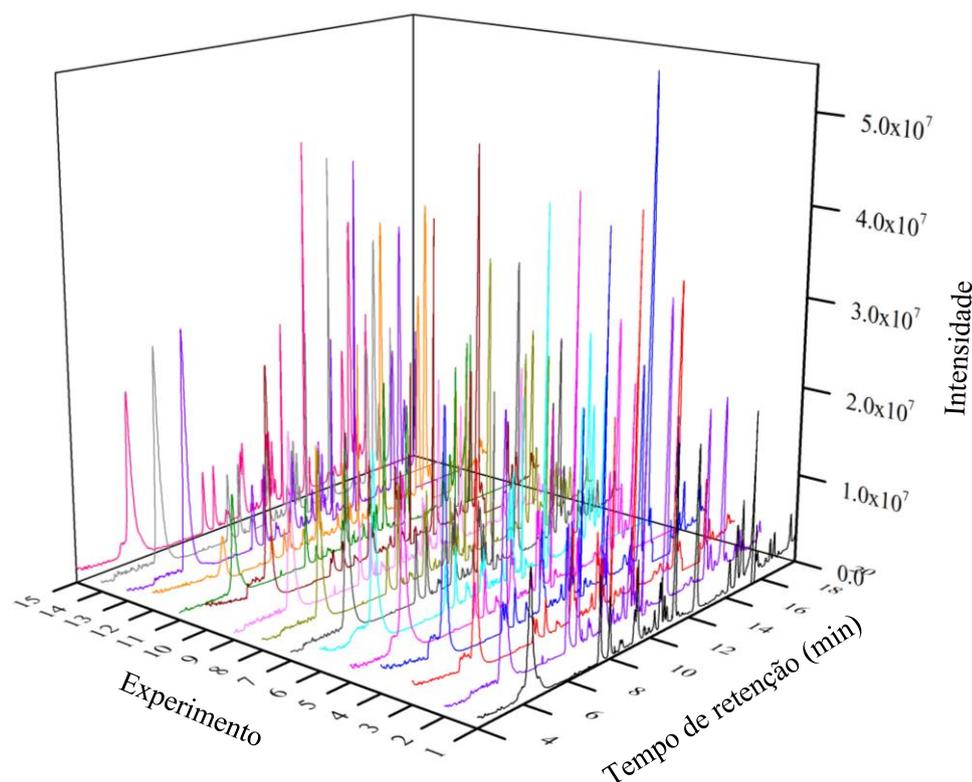
Martins e colaboradores (2020) realizaram a análise exploratória de cervejas *lager* de micro e macrocervejarias, utilizando a fibra mista de PDMS/DVB, e também reportaram coeficientes altos entre as replicatas, variando entre 10% e 40%, conforme o analito.⁵⁵ Para complementar, Nolvachai e colaboradores (2023) consideram o efeito de matriz como um dos principais desafios em relação a SPME, principalmente quando é realizada a análise

quantitativa, e recomendam o uso de padrão interno marcado isotopicamente. No entanto, esse tipo de padrão é de alto custo e nem sempre acessível.¹¹⁴

5.4. Otimização experimental da HS-SPME por planejamento Box-Behnken

Por meio da realização dos experimentos do planejamento BBD foram obtidos 15 cromatogramas, como representado na Figura 21.

Figura 21 – Cromatogramas de íons totais obtidos no planejamento Box-Behnken para cada um dos experimentos realizados.



A partir das respectivas áreas dos analitos em cada experimento, foram plotadas as superfícies de resposta que possibilitaram a análise de cada composto volátil em relação às diferentes condições experimentais estudadas, discutidas nos tópicos subsequentes.

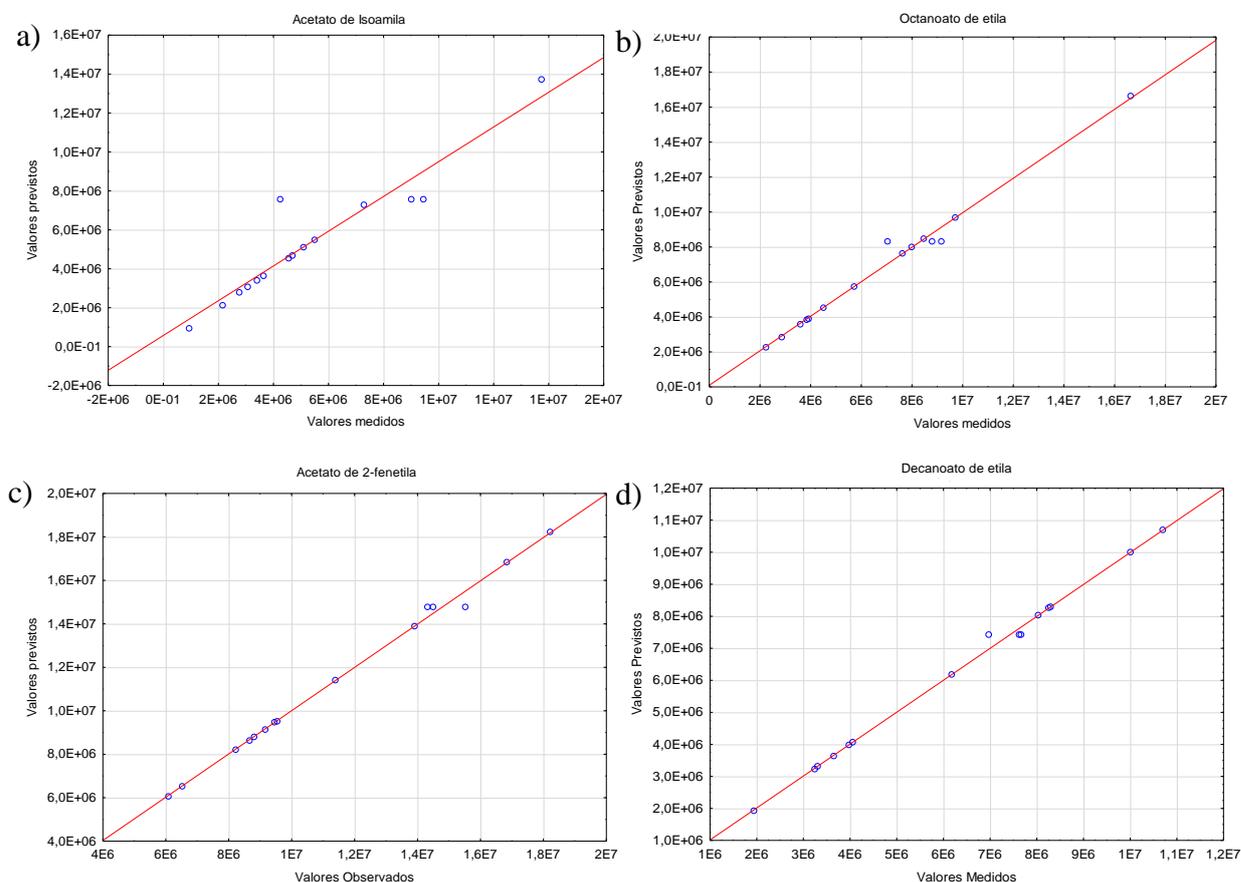
5.5. Ésteres

A partir da análise de variância (ANOVA), para avaliar a adequação dos modelos de regressão aos dados de cada analito, considerando-se interações lineares e quadráticas, foram obtidos os gráficos de valor previsto *versus* valor medido, mostrados na Figura 22.

Analisando os resultados da Figura 22, percebeu-se a adequação da maioria dos pontos relativos ao octanoato de etila, acetato de 2-fenetila e decanoato de etila aos modelos propostos, e a existência de alguns pontos discrepantes (*outliers*) para o acetato de isoamila. Com o intuito de complementar essa interpretação, foram avaliados os valores do coeficiente

de determinação (R^2), coeficiente de determinação ajustado (R^2_{ajustado}) e do p-valor obtido no cálculo da falta de ajuste, apresentados na Tabela 4.

Figura 22 – Gráficos de valor previsto *versus* medido para os ésteres a) acetato de isoamila, b) octanoato de etila, c) acetato de 2-fenetila e d) decanoato de etila.



Por meio da Tabela 4, observou-se que os valores de R^2 , que explica a variabilidade do modelo, e R^2_{ajustado} , que leva em consideração o número de observações e de parâmetros do modelo,⁹⁵ foram acima de 98% e 90%, respectivamente, para a maior parte dos analitos.

Tabela 4 – Parâmetros obtidos para os ésteres a partir da análise de variâncias, considerando-se interações lineares-quadráticas.

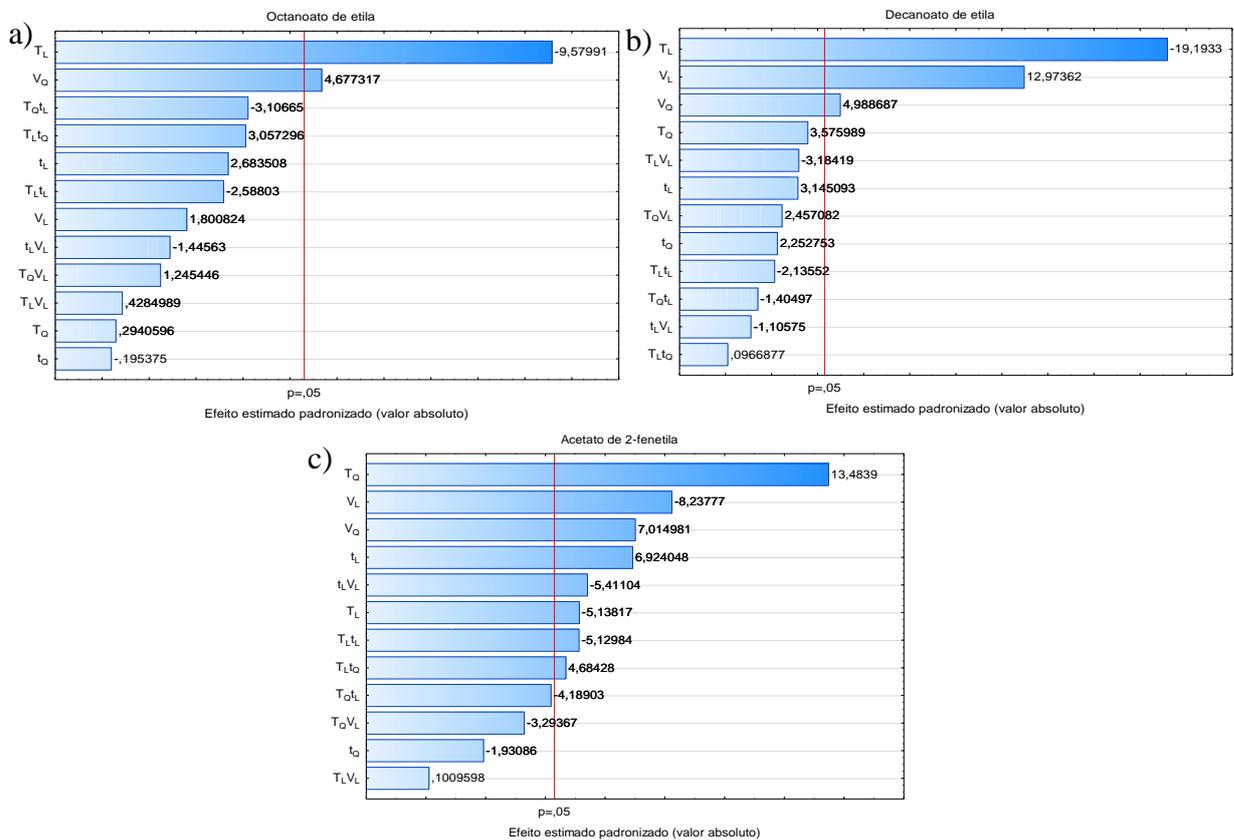
Analito	R^2	R^2_{ajustado}
Acetato de isoamila	0,89267	0,24868
Octanoato de etila	0,98618	0,90325
Decanoato de etila	0,99710	0,97971
Acetato de 2-fenetila	0,99586	0,97100

Em relação ao acetato de isoamila, quando foram consideradas as interações lineares e quadráticas, 89,3% da variabilidade dos dados pode ser explicada pelo modelo, porém o R^2_{ajustado} obtido teve valor próximo de zero. Isso pode indicar um sobreajuste do modelo, que

se ajustou para os dados medidos, mas falhou no ajuste dos dados previstos, o que limita sua generalização. Quando foram consideradas apenas as interações lineares, por sua vez, esses coeficientes também apresentaram valores baixos ($R^2 = 0,64847$; $R^2_{ajustado} = 0,01573$), o que significa que o modelo não explicou satisfatoriamente a variabilidade das respostas deste analito. Haja vista os resultados obtidos, o modelo foi considerado não adequado para a análise do acetato de isoamila.

Com o intuito de analisar visualmente os efeitos que influenciaram nas respostas dos analitos, foram obtidos os gráficos de Pareto, apresentados na Figura 23.

Figura 23 – Gráficos de Pareto para os ésteres a) octanoato de etila, b) decanoato de etila e c) acetato de 2-fenetila. As variáveis T, t e V indicam temperatura, tempo e volume, respectivamente. As letras sobrescritas “L” e “Q” indicam se a variável é linear ou quadrática na equação que descreve a superfície de resposta.



Retomando-se o conceito teórico, as barras do gráfico de Pareto são mostradas em ordem decrescente de magnitude dos efeitos e os valores apresentados em frente a cada barra correspondem aos valores absolutos dos efeitos padronizados, acompanhados pelo sinal correspondente (efeitos positivos ou negativos). Se as barras ultrapassam a linha do p-valor

de 0,05 (que corresponde ao valor de t calculado) os efeitos são estatisticamente significativos.⁹⁵

Avaliando-se a Figura 23, para o octanoato de etila dois fatores foram estatisticamente significativos. A variável temperatura (linear) teve efeito significativo negativo, indicando que o aumento da temperatura ocasionou a redução da área do octanoato de etila, ou seja, uma menor extração deste analito durante a análise HS-SPME. O volume (quadrático), por sua vez, apresentou efeito significativo positivo.

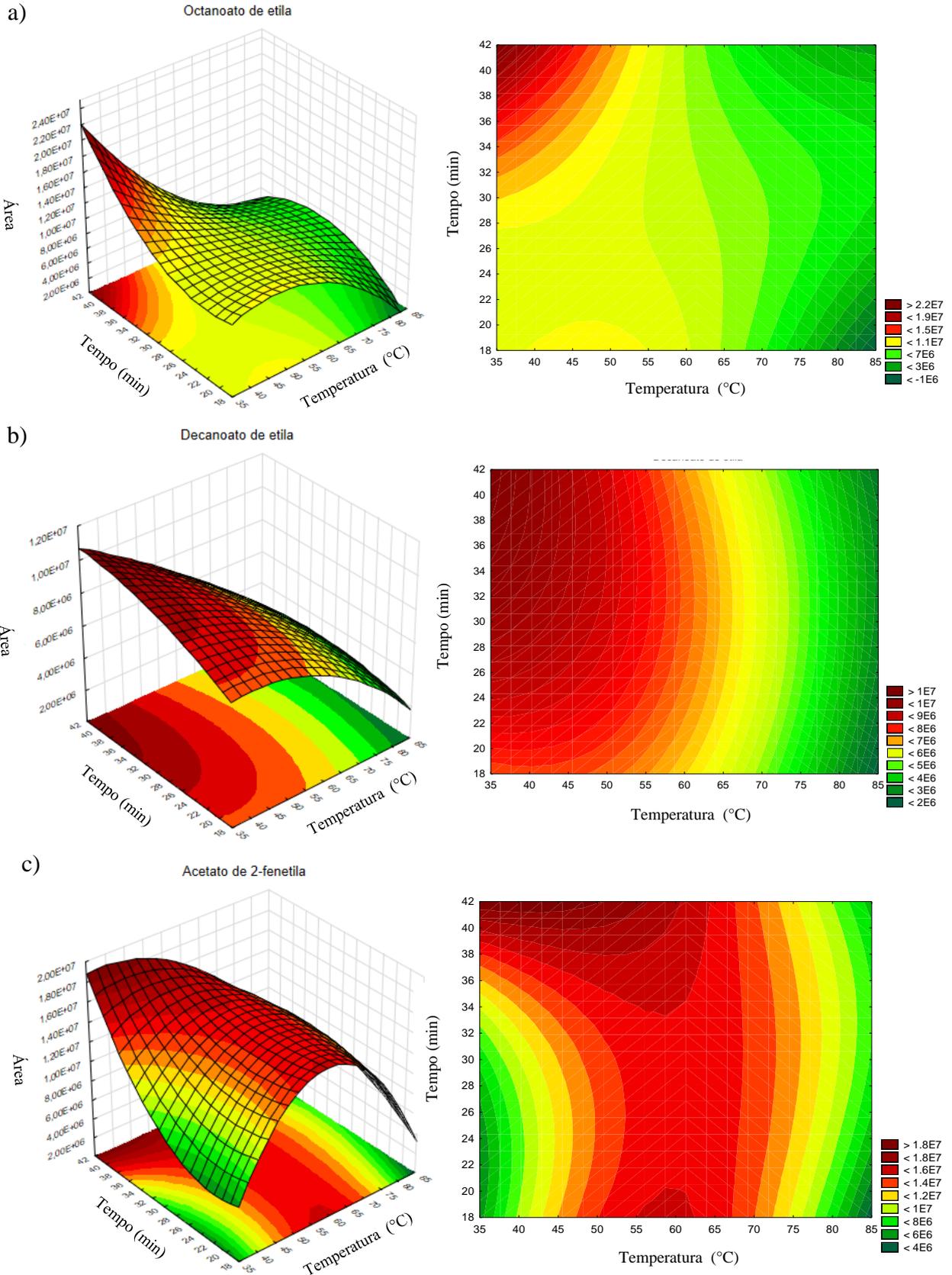
Um resultado semelhante foi obtido para o decanoato de etila, que apresentou efeito significativo negativo para a temperatura (linear) e efeitos significativos positivos para o volume (linear e quadrático). Nesse caso, aumentando-se a temperatura de extração e o volume de amostra, houve um aumento na extração do decanoato de etila.

Por fim, para o acetato de 2-fenetila houve uma maior abrangência de variáveis estatisticamente significativas, sendo elas lineares, quadráticas e de interações entre os fatores. Desta forma, a resposta do acetato de 2-fenetila é influenciada por vários fatores diferentes, bem como por diferentes combinações de interações entre os fatores, tornando o modelo mais complexo para este analito.

Para complementar as inferências realizadas, as superfícies de resposta dos ésteres foram plotadas e dispostas na Figura 24. Desta forma, observou-se que o octanoato de etila apresentou ponto de máximo, representado pela cor vermelha, em maiores tempos de extração e menores temperaturas. Para os outros analitos, porém, as melhores respostas foram obtidas em regiões mais extensas da superfície.

Para o acetato de 2-fenetila, valores mais altos das áreas dos picos foram obtidos na faixa de 45 °C a 70 °C, ao longo dos tempos avaliados. Já em se tratando do decanoato de etila, a faixa de melhores respostas na superfície indicou que, para este analito, temperaturas menores do que 50 °C proporcionaram uma maior extração. O comportamento observado nas respostas dos ésteres, em relação aos fatores estudados, também foi observado por Li e colaboradores (2015) após realização de um planejamento experimental para análise de voláteis em cervejas por HS-SPME.⁷

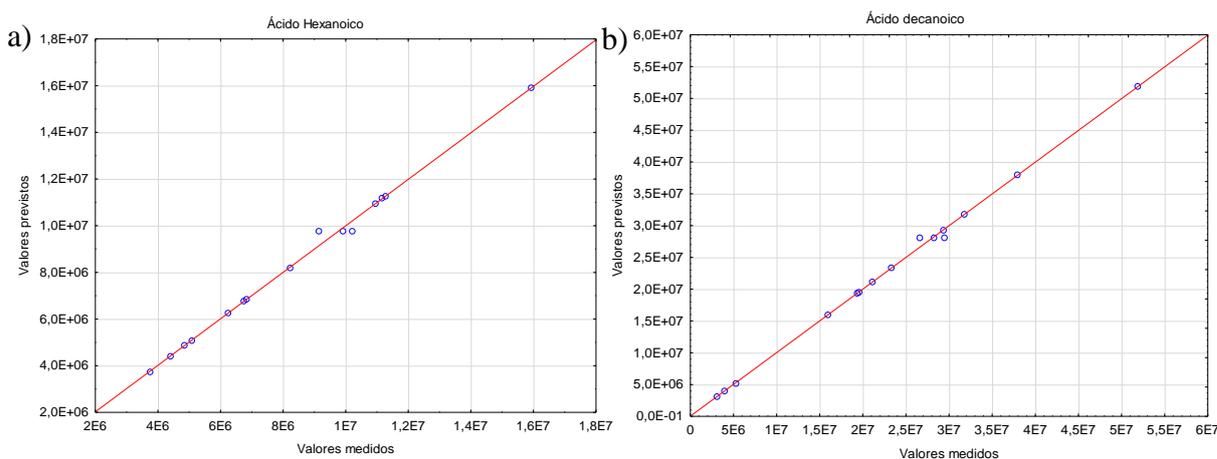
Figura 24 – Superfícies de resposta* obtidas para os ésteres a) octanoato de etila, b) decanoato de etila e c) acetato de 2-fenetila.



5.6. Ácidos orgânicos

Para os ácidos hexanoico e decanoico também foi avaliado o ajuste dos modelos de regressão aos dados, considerando-se as interações lineares e quadráticas. Os gráficos de valor previsto *versus* valor medido estão apresentados na Figura 25.

Figura 25 – Gráficos de valor previsto *versus* medido para os analitos a) ácido hexanoico e b) ácido decanoico.



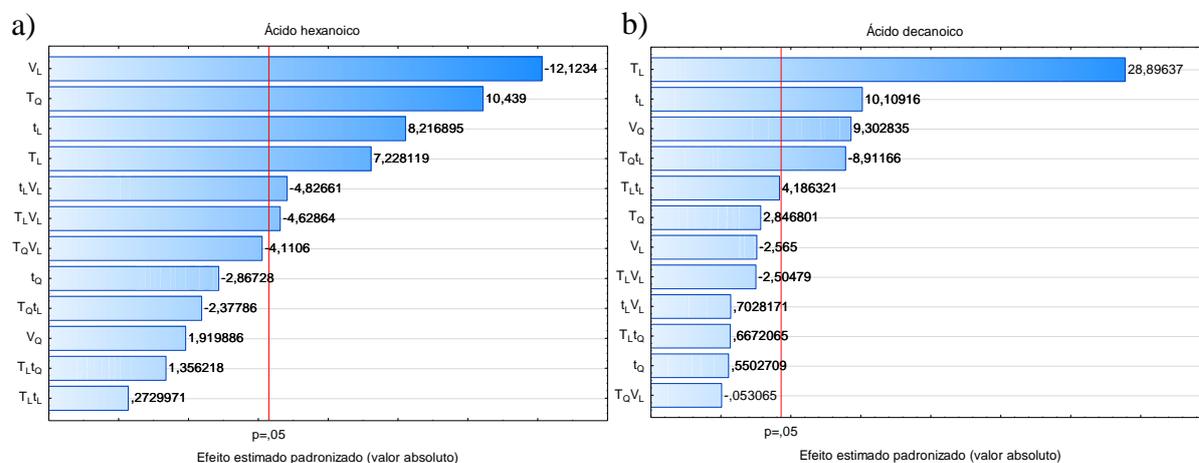
Analisando-se a Figura 25, os gráficos para o ácido hexanoico e decanoico apresentaram uma dispersão homogênea dos pontos em toda a faixa de valores, corroborada pelos coeficientes R^2 e $R^2_{ajustado}$ obtidos, mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Parâmetros obtidos para os ácidos a partir da análise de variâncias, considerando-se interações lineares-quadráticas.

Analito	R^2	$R^2_{ajustado}$
Ácido hexanoico	0,99618	0,97323
Ácido decanoico	0,99834	0,98838

A partir dos altos coeficientes apresentados na Tabela 5, pode-se inferir que uma grande parte da variação observada nas respostas dos ácidos foi explicada pelos fatores incluídos nos modelos, tornando-os adequados para representar os dados. Ademais, os gráficos de Pareto foram obtidos para análise dos fatores estatisticamente significativos nas respostas de cada analito, e apresentados na Figura 26.

Figura 26 – Gráficos de Pareto para os para os analitos a) ácido hexanoico e b) ácido decanoico. As variáveis T, t e V indicam temperatura, tempo e volume, respectivamente. As letras sobrescritas “L” e “Q” indicam se a variável é linear ou quadrática na equação que descreve a superfície de resposta.



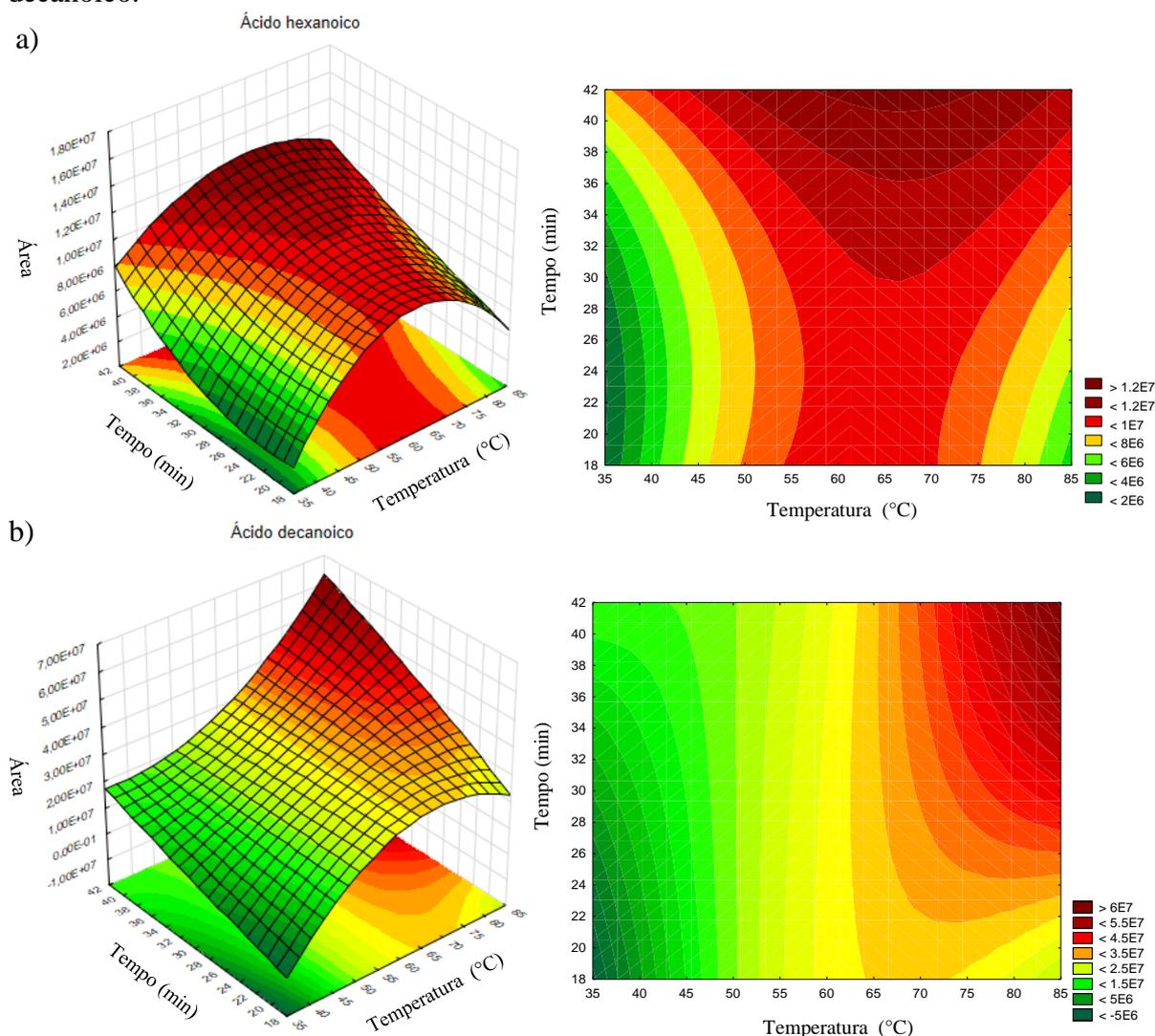
Para o ácido hexanoico, com a análise dos resultados apresentados na Figura 26 percebeu-se que variáveis lineares, quadráticas e de interações entre os fatores influenciam significativamente na resposta. A temperatura (linear e quadrática) e o tempo (linear) tiveram uma influência positiva, indicando que esses fatores em níveis mais altos geraram maiores respostas. No entanto, o volume (linear) e as interações lineares entre temperatura e volume, e tempo e volume tiveram efeito significativo negativo, implicando a obtenção de respostas mais baixas em níveis mais altos desses parâmetros.

Em se tratando do ácido decanoico, a temperatura e o tempo de extração (lineares), bem como volume de amostra (quadrático) tiveram efeito significativo positivo, indicando que um maior sinal do analito foi obtido em níveis maiores desses fatores. O efeito de interação entre a temperatura (quadrática) e o tempo (linear), porém, foi negativo. A interação curvilínea significativa torna o comportamento da resposta mais complexo em relação aos fatores envolvidos no estudo.

As superfícies de resposta foram, então, plotadas e estão dispostas na Figura 27. A partir da análise dos dados, verifica-se que as maiores respostas para o ácido hexanoico foram obtidas em uma região da superfície e variaram de acordo com o tempo de extração. Considerando-se níveis mais baixos do tempo, os valores ótimos de resposta foram obtidos entre 55 e 70 °C. À medida que se aumentou o tempo de extração, porém, uma faixa mais ampla de temperaturas permitiu a obtenção de maiores áreas.

Um comportamento diferente foi obtido para o ácido decanoico, em que as melhores respostas foram obtidas apenas em níveis mais altos de temperatura, por volta de 80 °C, e em tempos de extração mais altos.

Figura 27 – Superfícies de resposta* obtidas para os analitos a) ácido hexanoico e b) ácido decanoico.



*Para a obtenção das superfícies de resposta, o valor do volume de amostra foi mantido fixo em 4 mL.

De acordo com o trabalho de Rodriguez-Bencomo (2012) e colaboradores, que realizaram a análise de voláteis em cervejas Pilsen por HS-SPME e GC-MS, os melhores resultados para os ácidos ocorreram em temperaturas de extração mais altas e maiores tempos,¹⁰⁷ concordando com observado neste trabalho.

5.7. Álcoois

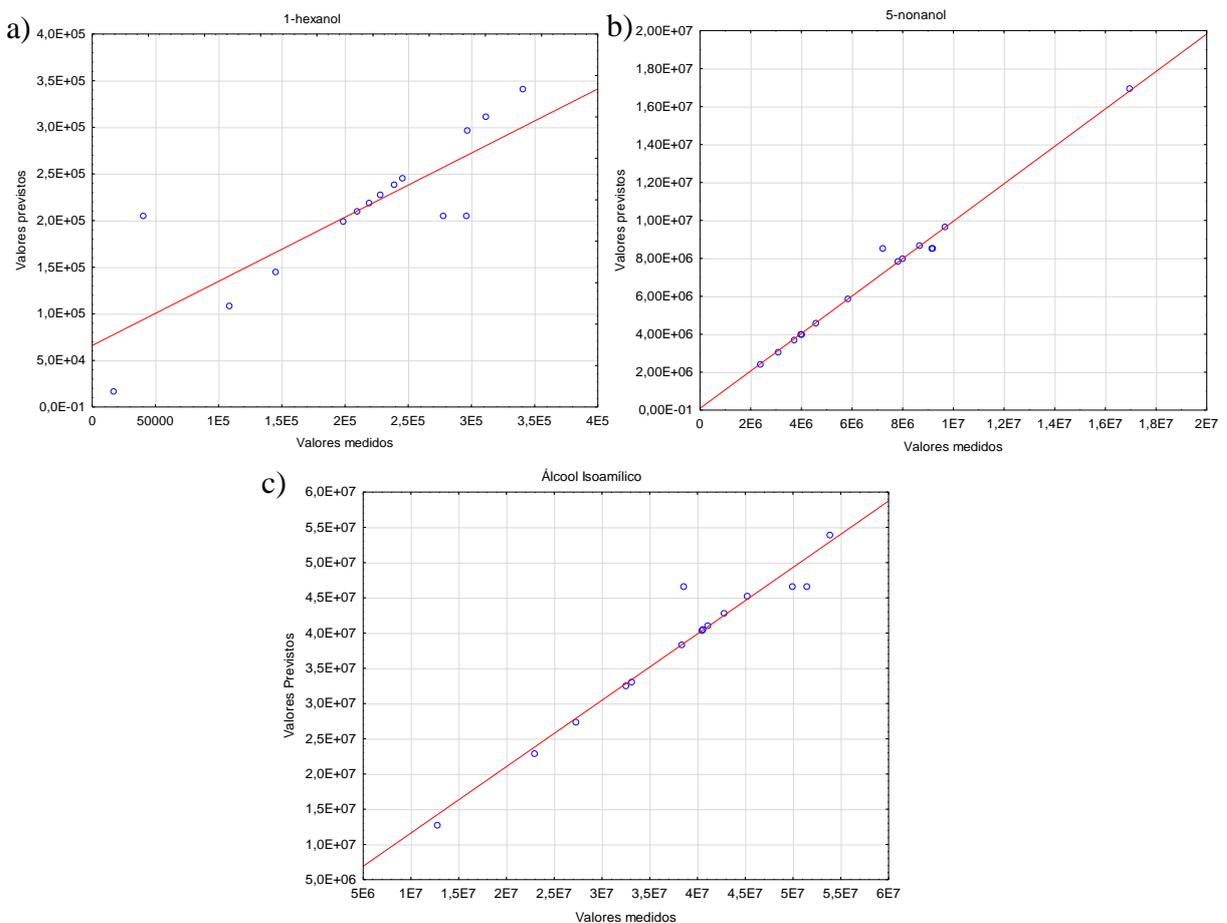
Para os álcoois, assim como para os analitos anteriormente abordados, foram avaliados os ajustes dos modelos de regressão dos dados, os gráficos de Pareto e as superfícies de

resposta para compreender os efeitos dos fatores e níveis estudados perante as respostas de cada composto.

5.7.1. Álcoois superiores

De acordo com os gráficos de valor previsto *versus* valor medido plotados na Figura 28, abaixo, pode-se visualizar a adequação dos modelos de regressão aos dados de cada analito. Para o 5-nonanol, grande parte dos pontos se manteve distribuída ao longo da linha de tendência, enquanto para o álcool isoamílico houve dispersão de alguns pontos. Para o 1-hexanol, por sua vez, observou-se que os pontos medidos e previstos apresentaram maior dispersão ao redor da linha de tendência, não seguindo um padrão homogêneo. Isso pode ter ocorrido pelo fato de o pico do n-hexanol ser muito pequeno em comparação aos demais, assimilando-se a um ruído nos cromatogramas, sendo necessária uma metodologia que possua maior sensibilidade para sua melhor detecção.

Figura 28 – Gráficos de valor previsto *versus* medido para os analitos a) 1-hexanol, b) 5-nonanol e c) álcool isoamílico.



Por sua vez, observando-se os valores de R^2 e $R^2_{ajustado}$ evidenciados na Tabela 6 pode-se inferir que o modelo matemático para o 5-nonanol foi o mais satisfatório dentre os demais.

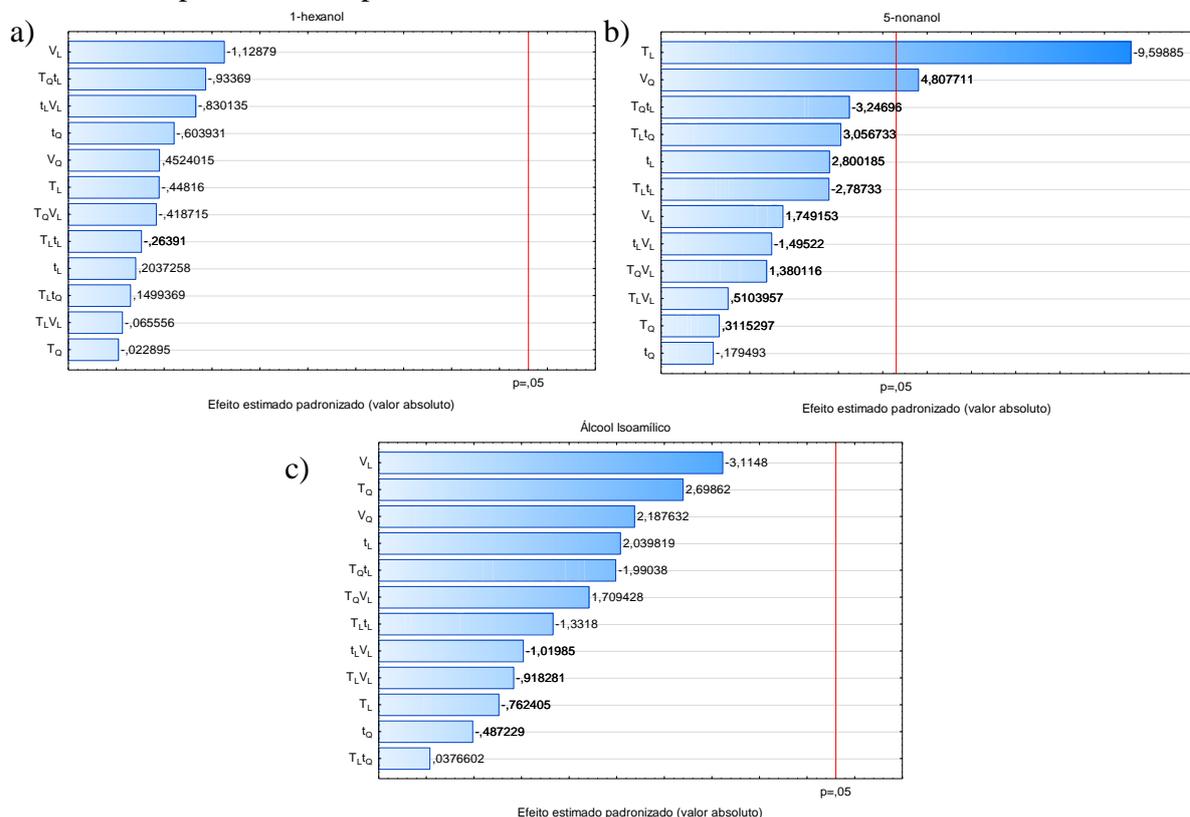
Para o álcool isoamílico o modelo conseguiu prever aproximadamente 60% da variabilidade dos dados, considerando o número de observações e de parâmetros do modelo e, para o 1-hexanol, o coeficiente de determinação foi menor do que 0,7.

Tabela 6 – Parâmetros obtidos para os álcoois superiores a partir da análise de variâncias, considerando-se interações lineares-quadráticas.

Analito	R ²	R ² ajustado
1-hexanol	0,68765	-
5-nonanol	0,98658	0,90609
Álcool isoamílico	0,94232	0,59625

Testando-se o modelo considerando apenas interações para o 1-hexanol, obteve-se R² de 0,5206 e R² ajustado com valor próximo de zero, desta forma ambos os modelos não foram suficientemente satisfatórios para explicar a variabilidade dos dados. Além das inferências realizadas, almejando-se visualizar os fatores significativos para cada um dos álcoois superiores estudados, os gráficos de Pareto estão dispostos na Figura 29.

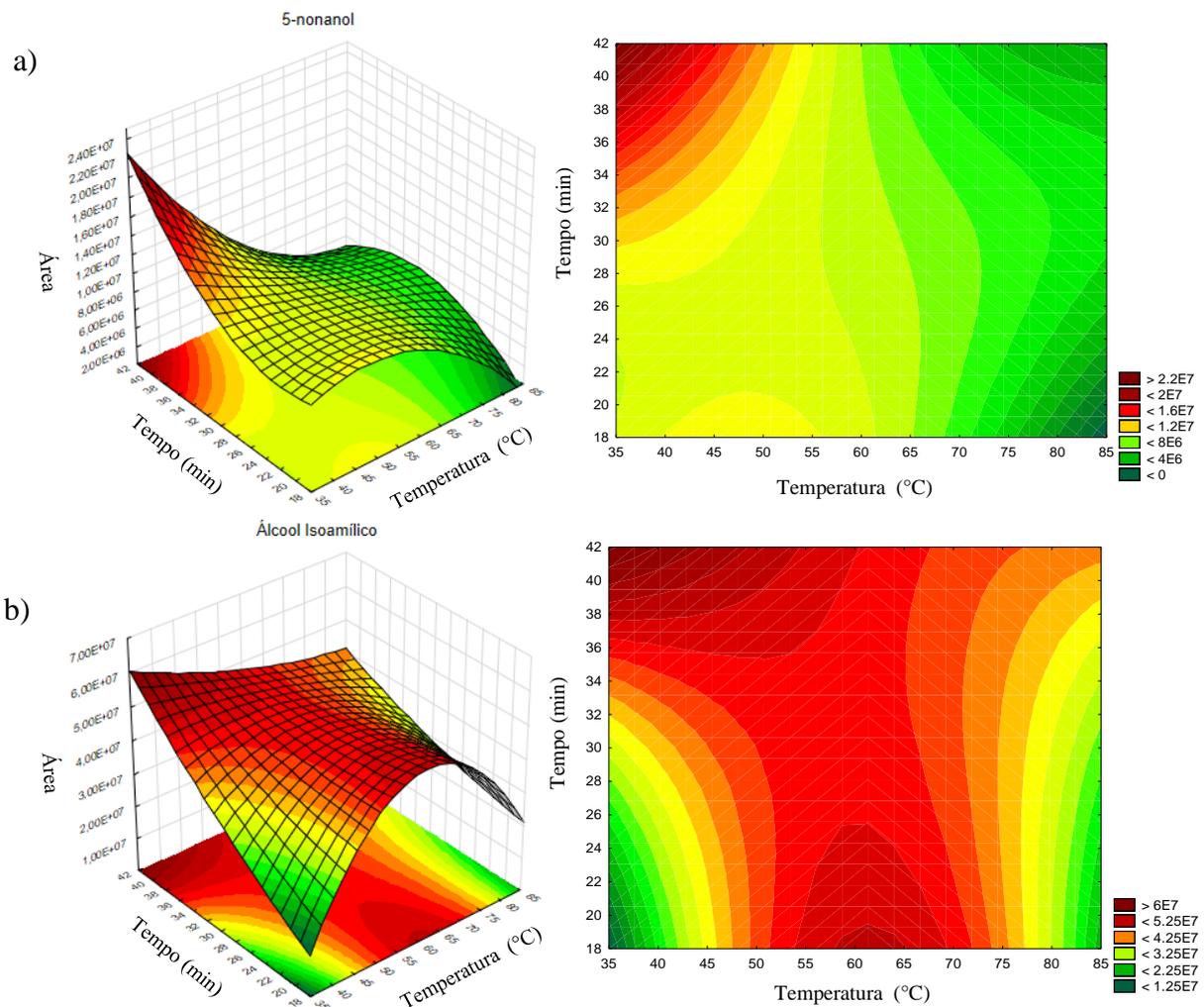
Figura 29 – Gráficos de Pareto para os para os analitos a) 1-hexanol, b) 5-nonanol e c) álcool isoamílico. As variáveis T, t e V indicam temperatura, tempo e volume, respectivamente. As letras sobrescritas “L” e “Q” indicam se a variável é linear ou quadrática na equação que descreve a superfície de resposta.



Ao visualizar a Figura 29, no caso do 5-nonanol dois fatores foram estatisticamente significativos. A variável temperatura (linear) teve efeito significativo negativo, indicando que o aumento da temperatura ocasionou a redução da extração do 5-nonanol. O volume (quadrático), no entanto, apresentou efeito significativo positivo.

Para o 1-hexanol e para o álcool isoamílico nenhum dos fatores foi estatisticamente significativo. Para o 1-hexanol, pelo fato de o modelo matemático não ter sido suficientemente adequado para realizar previsões, o modelo foi considerado não adequado para a análise desse álcool. Em se tratando do álcool isoamílico, por sua vez, o fato de nenhuma variável ter sido significativa indica que a variação dos níveis dos fatores não afetou a extração desse composto. Para este analito, os fatores utilizados em seus níveis mais baixos são suficientes para a extração eficaz. Por fim, as superfícies de resposta dos analitos com modelos satisfatórios estão plotadas na Figura 30.

Figura 30 – Superfícies de resposta* obtidas para o a) 5-nonanol e b) álcool isoamílico.



*Para a obtenção das superfícies de resposta, o valor do volume de amostra foi mantido fixo em 4 mL.

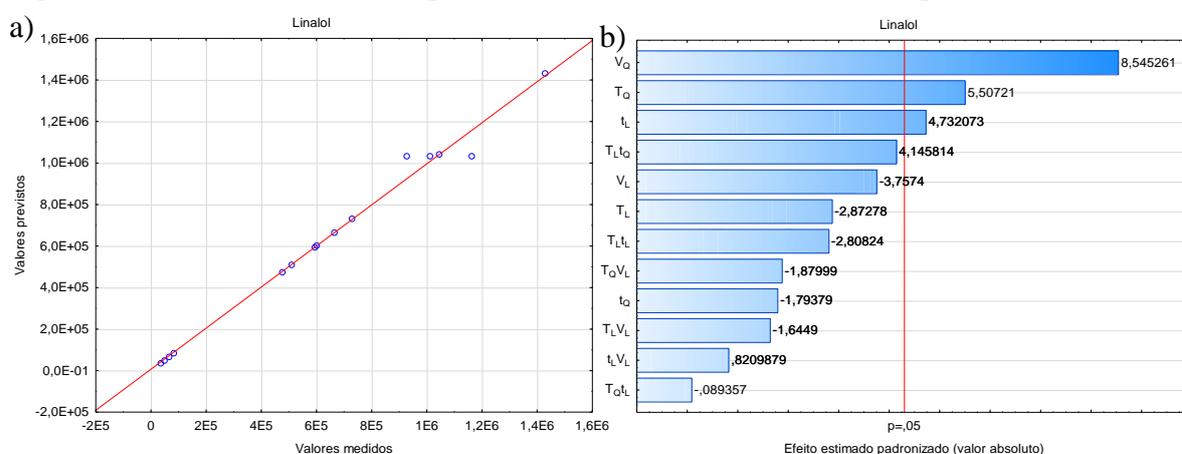
Por meio da Figura 30, para o 5-nonanol as respostas máximas foram obtidas em níveis mais altos de tempo e mais baixos de temperatura. A avaliação da superfície de resposta do 5-nonanol foi importante para compreender o comportamento do padrão interno perante as diferentes condições avaliadas.

Para o álcool isoamílico as melhores respostas foram obtidas em uma região da superfície, comportamento já verificado para outros analitos anteriormente analisados. Em tempos menores, a região de 50 °C a 75 °C apresentou sinais mais altos. Para extrações de maior tempo, entretanto, respostas ótimas também foram obtidas para temperaturas em níveis mais baixos.

5.7.2. Álcool monoterpênico

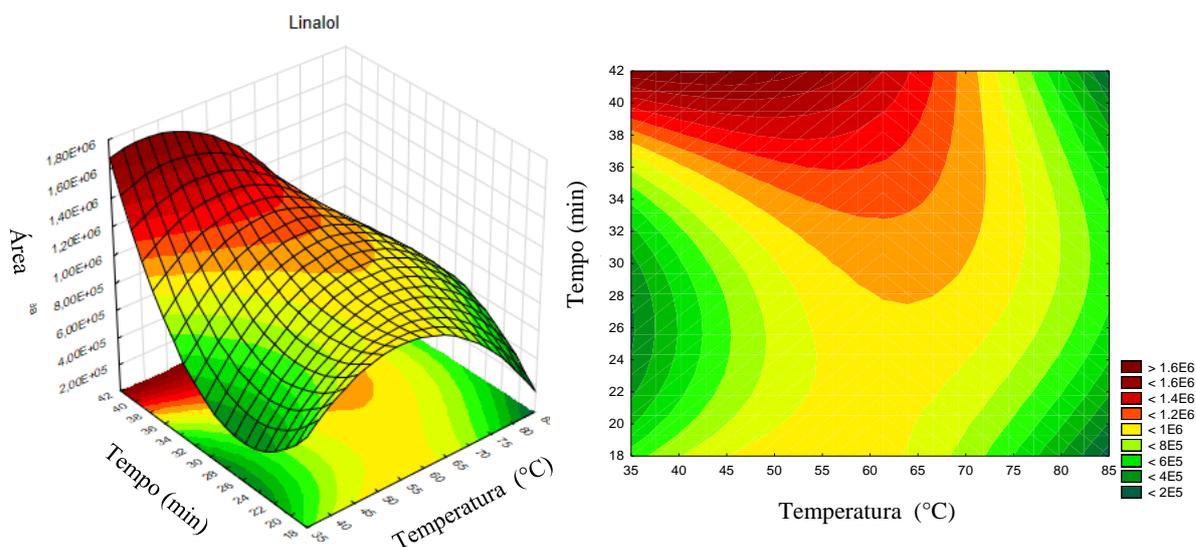
O linalol foi o terpeno avaliado e apresentou R^2 de 0,98930 e $R^2_{ajustado}$ 0,92511, valores que demonstram que o modelo explica adequadamente a variabilidade dos dados. Isso pode ser visualizado a partir do gráfico de valor previsto *versus* medido, mostrado na Figura 31a, em que a maioria dos pontos apresentou uma distribuição uniforme em torno da linha ideal.

Figura 31 – Gráficos a) de valor previsto *versus* medido e b) de Pareto para o linalol.



Em se tratando dos fatores que contribuiriam para as respostas do linalol, na Figura 31b foi apresentado o Gráfico de Pareto, para avaliação visual dos efeitos significativos. Como pode ser observado, três fatores foram estatisticamente significativos, sendo eles a temperatura e o volume quadráticos, bem como o tempo linear. A partir da visualização da Figura 32, maiores tempos de extração e temperaturas mais baixas favoreceram maiores respostas para o linalol. Zanella e colaboradores obtiveram resultados semelhantes para os álcoois quando realizaram um planejamento de experimentos para encontrar as condições ótimas dos analitos em três tipos de cerveja por HS-SPME.⁴⁹

Figura 32 – Superfície de resposta* obtida para linalol.

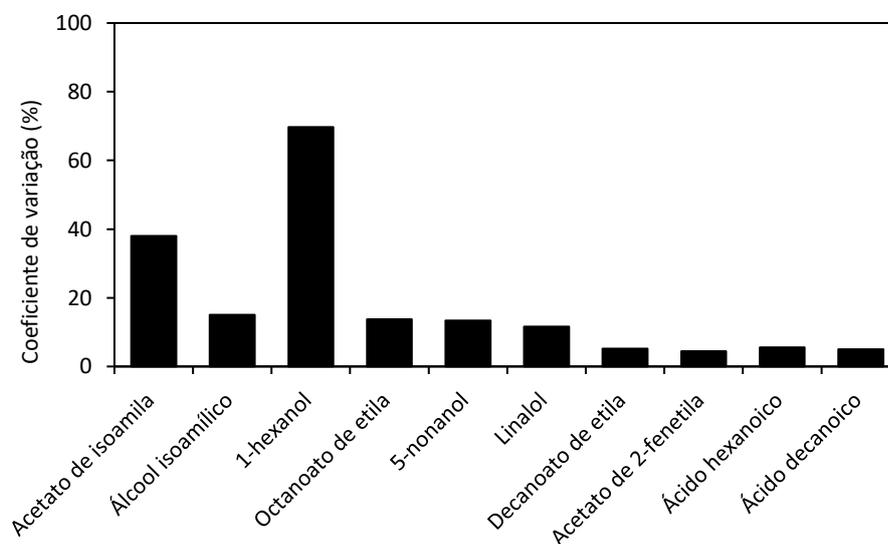


*Para a obtenção da superfície de resposta, o valor do volume de amostra foi mantido fixo em 4 mL.

5.8. Definição das condições ótimas

Como discutido anteriormente, cada analito apresentou um comportamento singular em relação às variáveis independentes estudadas. Para os compostos acetato de isoamila e 1-hexanol, as variabilidades explicadas pelos modelos foram baixas, além de apresentarem, a partir da triplicata no ponto central, coeficientes de variação muito discrepantes em relação aos demais analitos, como mostrado no gráfico da Figura 33.

Figura 33 – Coeficientes de variação para cada analito no planejamento *Box-Behnken*.



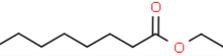
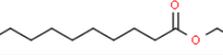
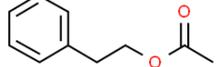
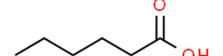
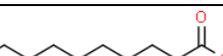
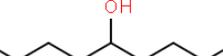
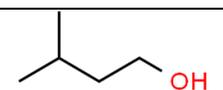
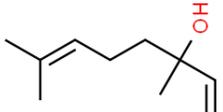
A partir dos resultados, optou-se, então, por não utilizar os analitos acetato de isoamila e 1-hexanol na análise das amostras. A fim de reunir as informações relevantes dos resultados do planejamento experimental BBD em relação aos fatores significativos obtidos para cada analito, bem como as regiões de respostas mais altas, a partir das superfícies de resposta, um resumo das informações foi apresentado no Quadro 12.

Quadro 12 – Resumo de informações obtidas para cada analito após realização de planejamento experimental Box-Behnken. As variáveis T, t e V indicam temperatura, tempo e volume, respectivamente. As letras sobrescritas “L” e “Q” indicam se a variável é linear ou quadrática na equação que descreve a superfície de resposta.

Classe Química	Analito	Fatores estatisticamente significativos				Majores Respostas (Superfície)
		T (°C)	t (min)	V (mL)	Interações	
Ésteres	Octanoato de etila	T _L	-	V _Q	-	T < 50 °C t > 30 min
	Decanoato de Etila	T _L	-	V _L , V _Q	-	T < 50 °C
	Acetato de 2-fenetila	T _L , T _Q	t _L	V _L , V _Q	T _Q t _L T _L t _Q T _L t _L t _L V _L	t baixo: 45 < T < 70 °C t alto: T < 70 °C
Ácidos carboxílicos	Ácido hexanoico	T _L , T _Q	t _L	V _L	T _L V _L t _L V _L	50 < T < 70 °C
	Ácido decanoico	T _L	t _L	V _Q	T _Q t _L	T > 65 °C
Álcoois	5-nonanol	T _L	-	V _Q	-	T < 50 °C t > 30 min
	Álcool isoamílico	-	-	-	-	t baixo: 50 < T < 75 °C t alto: T < 75 °C
Terpeno	Linalol	T _Q	t _L	V _Q	-	T < 60 °C t > 35 min

Para compreender o comportamento de cada analito, alguns aspectos considerados podem ser a estrutura química, como por exemplo a existência de cadeias ramificadas ou lineares, o tamanho da cadeia (quantidade de carbonos) e o tipo de grupo funcional. Essas características influenciam em propriedades físicas como a temperatura de ebulição e a polaridade dos compostos. Por consequência, impactam no coeficiente de partição e na celeridade em que os voláteis passam da matriz para o *headspace* e, posteriormente, são sorvidos pela fibra.²⁸ No Quadro 13 estão dispostas algumas propriedades físico-químicas dos analitos avaliados no planejamento BBD.

Quadro 13 – Propriedades físico-químicas dos voláteis avaliados no Planejamento Box- Behnken.

Classe Química	Analito	Propriedades físico-químicas ¹¹⁵			
		Fórmula estrutural	Fórmula Química	Massa Molar (g mol ⁻¹)	Tebulição (°C)
Ésteres	Octanoato de etila		C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172,26	209
	Decanoato de Etila		C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200,31	245
	Acetato de 2-fenetila		C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164,20	238
Ácidos carboxílicos	Ácido hexanoico		C ₆ H ₁₂ O ₂	116,15	205
	Ácido decanoico		C ₁₀ H ₂₀ O ₂	172,26	269
Álcoois	5-nonanol		C ₉ H ₂₀ O	144,25	195
	Álcool isoamílico		C ₅ H ₁₂ O	88,14	130
Terpeno	Linalol		C ₁₀ H ₁₈ O	154,24	198

Observando-se as informações dos Quadros 12 e 13, os ácidos carboxílicos apresentaram melhores respostas em temperaturas mais altas se comparado aos demais analitos. Esses compostos têm alta solubilidade em água quando possuem cadeia carbônica curta, mas à medida que cadeia carbônica aumenta, maior a hidrofobicidade e a temperatura necessária para a volatilização.¹¹⁶

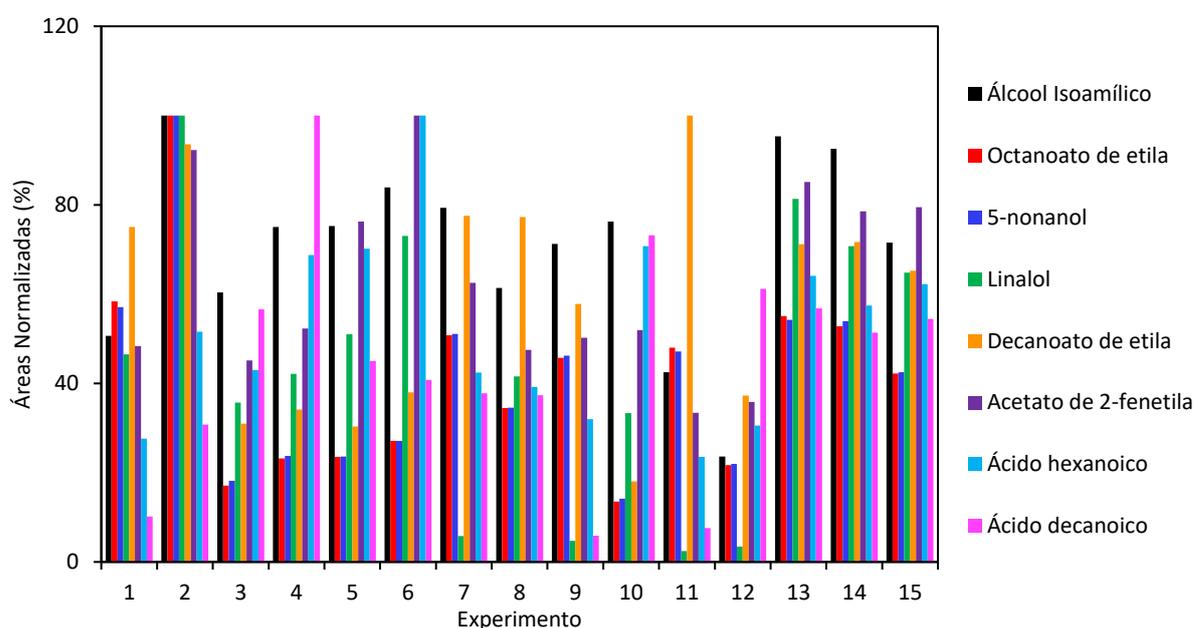
Para os álcoois, por sua vez, respostas ótimas puderam ser encontradas em menores temperaturas de extração. Além de apresentarem menores temperaturas de ebulição, se comparado aos outros compostos, a interação com o material de revestimento da fibra também teve influência. A fibra PA tem maior afinidade com compostos polares e já foi reportada como a mais apropriada para extração de álcoois superiores, se comparada a outros tipos de revestimentos.²⁸

Com base nas informações anteriormente apresentadas foi possível ter uma noção geral das informações obtidas com o planejamento BBD e das particularidades dos analitos, mas a definição de uma condição experimental ótima ainda não foi de fácil interpretação. Assim, complementando as inferências já realizadas e com a finalidade de se compreender

melhor e visualmente as condições que satisfariam as melhores respostas para cada composto da cerveja, realizou-se o cálculo das áreas normalizadas.

Para tanto, elencou-se a área máxima de cada analito frente a todos os experimentos e dividiu-se o valor da área do analito obtida em cada experimento pela sua área máxima, multiplicando-se o resultado por 100. De posse dos resultados calculados, foi plotado o gráfico mostrado na Figura 34 em que as áreas normalizadas para cada analito estão dispostas em relação ao respectivo experimento.

Figura 34 – Gráfico de Áreas Normalizadas versus Experimento Box-Behnken



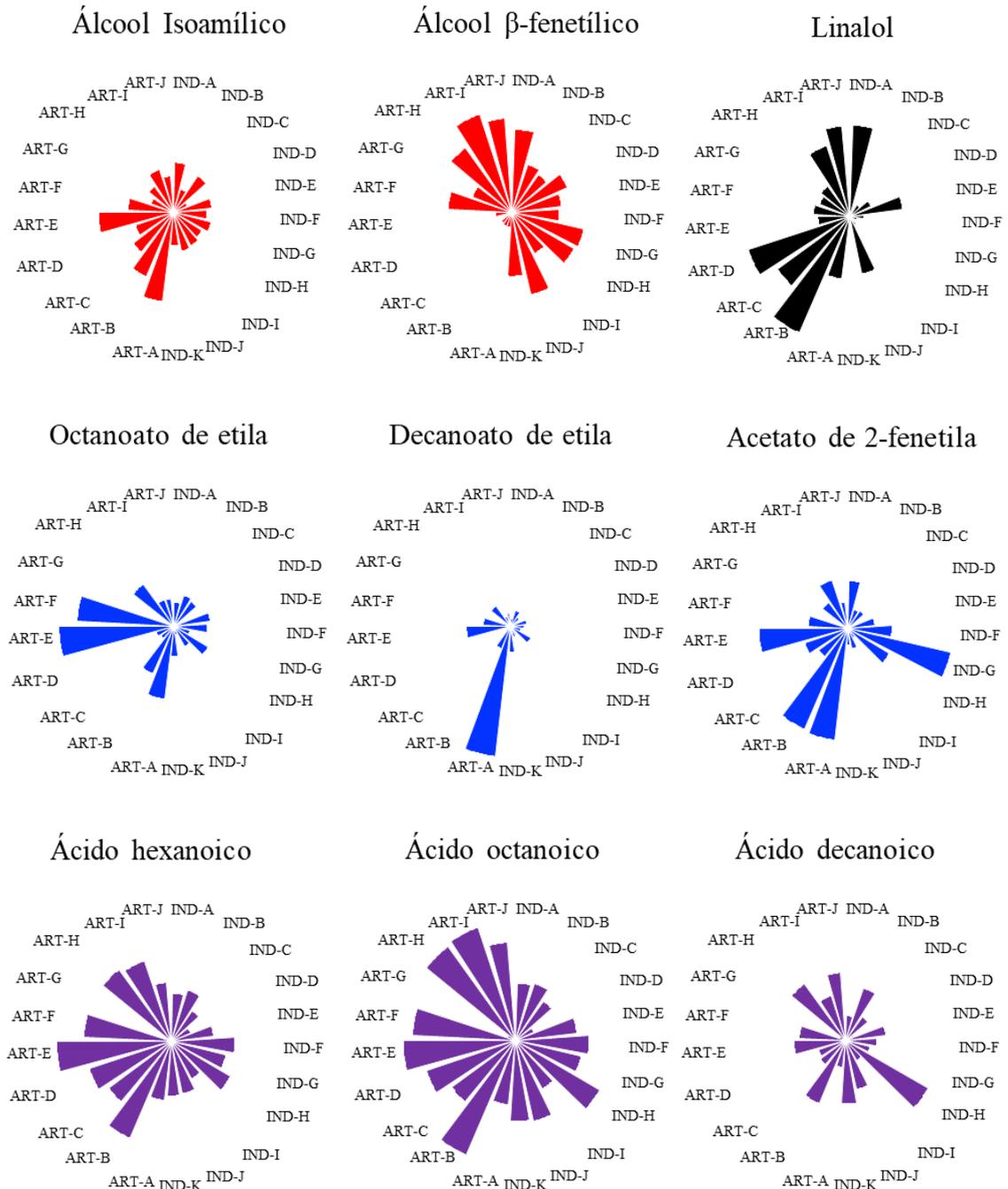
Analisando-se a Figura 34, notou-se que no Experimento 2 do planejamento BBD foram obtidas as áreas máximas para os analitos álcool isoamílico, octanoato de etila, 5-nonanol e linalol. Neste experimento, decanoato de etila e acetato de 2-fenetila apresentaram áreas normalizadas com percentual maior que 90% e os ácidos orgânicos hexanoico e decanoico apresentaram percentual de aproximadamente 50% e 30%, respectivamente. Visto que foi obtido um percentual alto das áreas normalizadas, para a maioria dos analitos, o Experimento 2 foi escolhido como sendo as condições ótimas para a análise das amostras de cerveja Pilsen. Assim, retomando-se as informações da Tabela 2, as condições ótimas foram temperatura de extração de 40 °C, tempo de extração de 40 min e volume de amostra igual a 4 mL.

5.9. Perfil de voláteis das cervejas Pilsen

Após a realização das análises HS-SPME, a partir dos cromatogramas obtidos e das áreas médias para cada analito avaliado, corrigidas pelo padrão interno, foram observadas

qualitativamente distinções entre o perfil de voláteis das amostras, que estão plotadas nos gráficos da Figura 35.

Figura 35 – Perfil de voláteis obtidos para cervejas artesanais e industriais, a partir das áreas cromatográficas médias corrigidas para cada analito.



Como pode ser observado Figura 35, em relação ao grupo dos álcoois, notou-se uma proeminência do sinal do álcool isoamílico em amostras artesanais, enquanto o sinal do álcool β-fenetílico variou entre as cervejas, sendo detectado em sinais mais intensos também nas

industriais. Esses analitos já foram reportados como os mais abundantes, dentre os álcoois superiores de cervejas,¹¹⁷ e sua síntese está intimamente ligada ao metabolismo dos aminoácidos presentes no mosto, que são fontes de nitrogênio para as leveduras.²⁹

Maiores concentrações de álcool β -fenetílico implicam um aroma final da cerveja agradável, com caráter doce, floral e perfumado.¹⁰⁶ O álcool isoamílico, por sua vez, contribui com notas frutadas e influencia na facilidade em que a cerveja é bebida (termo em inglês *drinkability*), pois à medida que sua concentração aumenta pode tornar o aroma da cerveja mais forte e pungente.^{29,106} A formação destes e de outros álcoois superiores presentes na cerveja depende da cepa de levedura utilizada, visto que o genoma associado a esta define o perfil de voláteis final do produto. A temperatura também exerce papel fundamental na formação dos álcoois superiores.¹¹⁸

Com relação ao linalol, foi possível observar a predominância deste composto em cervejas artesanais, em detrimento das industriais. O linalol é um monoterpene importante por seu caráter floral, cítrico e frutado.^{119,120} Pode ser formado a partir da decomposição do geraniol pelas leveduras e como produto biossintético do mirceno, ambos compostos presentes no óleo essencial do lúpulo.¹²⁰

A discrepância observada para o linalol pode ser explicada pelo fato de que a concentração final do linalol na cerveja pode variar de acordo com a quantidade de lúpulo adicionada por cada fabricante e o tempo utilizado na etapa de fervura.¹²⁰ Além disso, em cervejarias industriais comumente é utilizado o extrato de lúpulo, enquanto cervejarias artesanais fazem uso do ingrediente no formato de *pellets*.^{55,56} Estudos prévios reportaram diferenças entre a composição dos voláteis do lúpulo de acordo com a forma como é comercializado, sendo relatados maiores teores de monoterpenos quando utilizado o lúpulo em *pellet*,^{56,121} o que justifica os resultados obtidos para as cervejas artesanais.

Em relação aos ésteres avaliados, estudos do perfil de voláteis em cervejas já identificaram o octanoato de etila, o decanoato de etila e o acetato de 2-fenetila como sendo alguns dos mais importantes e que agregam no perfil aromático à bebida, incorporando caráter frutado, floral e doce, como de maçã, rosas e mel.^{106,113,118} Esses ésteres são formados pela condensação de álcoois com ácidos orgânicos, durante a fermentação, e a diferença entre eles é que o acetato de 2-fenetila é formado a partir da reação entre o ácido acético com um álcool superior ou com o etanol, gerando um acetato. Para o octanoato de etila e o decanoato de etila, por sua vez, o etanol forma uma parte do radical e um ácido graxo de cadeia média (C₆-C₁₂) compõe a outra.¹¹⁸

Observando-se a Figura 35, nota-se que houve predominância dos ésteres em cervejas artesanais. Assim como para os álcoois superiores, a cepa de levedura utilizada também influencia na formação desses compostos,⁶ bem como a disponibilidades das substâncias precursoras (álcoois e ácidos) e o balanço enzimático da reação.¹¹⁸ Além disso, Pires e colaboradores (2014) salientam que a temperatura tem grande influência na produção dos ésteres, que podem ter sua síntese aumentada em até 75% a partir de um breve aumento de 10 °C para 12 °C durante a fermentação.¹¹⁸ Logo, o controle realizado pelas cervejarias artesanais pode ter contribuído para a maior formação de ésteres, se comparado às industriais.

Por fim, os ácidos orgânicos foram avaliados. Os sinais dos ácidos hexanoico e decanoico foram mais intensos nas cervejas artesanais enquanto o ácido decanoico teve proeminência para ambas as categorias. Esses ácidos podem acrescentar aroma frutado à cerveja, mas também aspecto gorduroso, semelhança a queijo, adstringência e caráter rançoso, se acima do limiar de percepção.¹¹⁷ A formação desses analitos ocorre durante a fermentação e a cepa de levedura utilizada pode influenciar no processo. Ademais, a síntese dos ácidos orgânicos pode ser influenciada pelo mosto, no que tange à sua composição, densidade e nível de aeração.¹²² Neste caso, processos distintos para cada fabricante, mesmo que dentro dos parâmetros do estilo Pilsen, podem ter influenciado no aspecto final dos ácidos nas amostras analisadas.

5.10. Análise multivariada

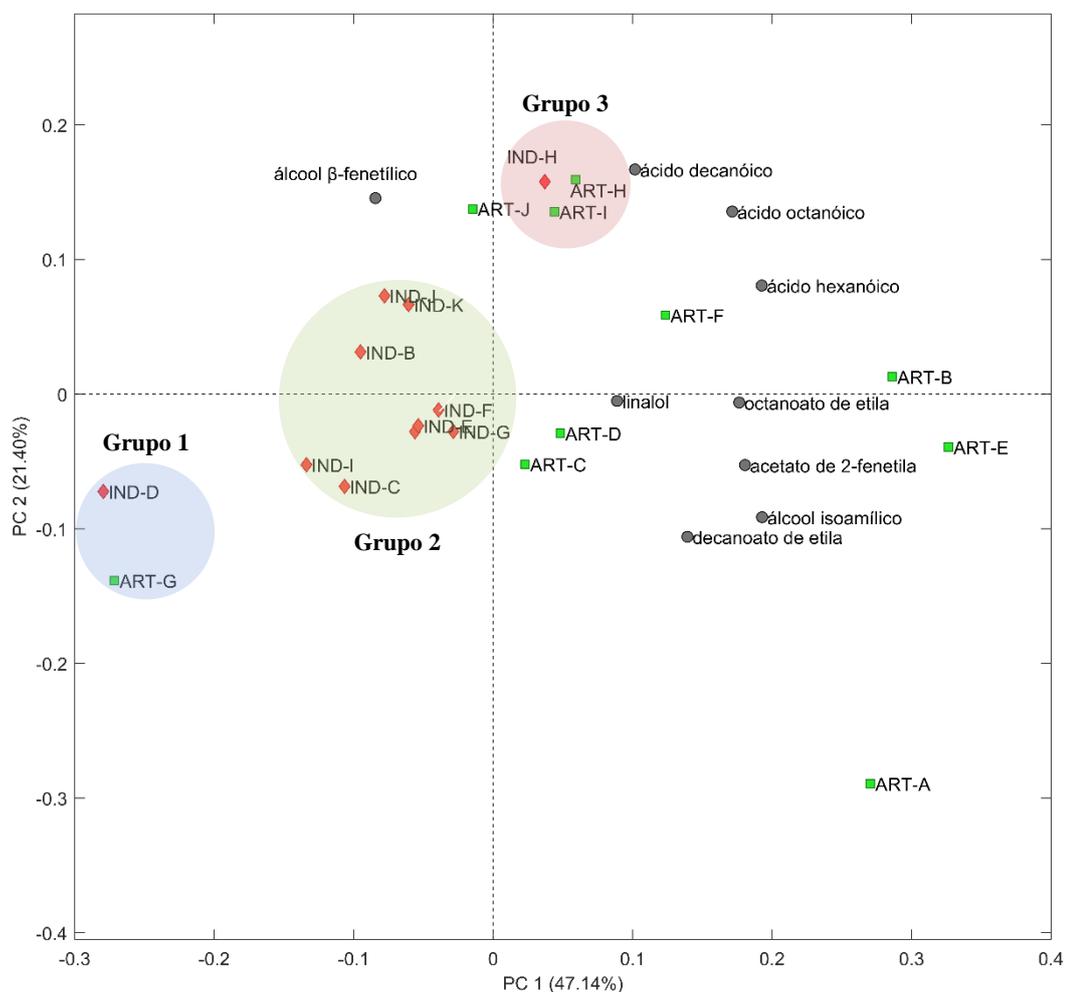
Para se compreender as similaridades ou diferenças entre as amostras de cerveja, uma análise de componentes principais (PCA) foi realizada, utilizando-se as áreas médias corrigidas para cada analito. Para tanto, foi desenvolvido um modelo contendo duas componentes principais, PC1 e PC2, que juntas representam 67,71% da variância total dos dados, como pode ser visto na Tabela 7.

Tabela 7 – Componentes principais da PCA e variâncias explicadas e cumulativas.

Componente Principal	Variância Explicada (%)	Variância Cumulativa (%)
1	46,77	46,77
2	20,94	67,71
3	13,57	81,28
4	7,71	89,00
5	4,53	93,53
6	3,93	97,47
7	1,49	98,96
8	0,87	99,84
9	0,15	100,00

Os *scores* e os *loadings* obtidos foram utilizados para a obtenção do gráfico biplot de PC1 versus PC2, que estão dispostos na Figura 36.

Figura 36 – *Biplot* da análise de componentes principais para as amostras de cerveja artesanais (ART) e industriais (IND) em relação aos ésteres, álcoois e ácidos orgânicos analisados.



Analisando-se a Figura 36, primeiramente foi possível observar que a PC1 foi a componente responsável pela diferenciação entre as amostras artesanais e industriais e que o álcool β-fenético foi o analito principal para a classificação dos agrupamentos relativos às amostras industriais. A PC2, por sua vez, classificou as amostras artesanais principalmente entre os ésteres (*loading* negativo) e os ácidos orgânicos (*loading* positivo).

Para a compreensão das relações entre as amostras e os analitos, primeiramente foram delineadas na Figura 36 três regiões de proximidade entre os resultados, indicando que as amostras apresentaram similaridades entre si. Essas regiões foram denotadas como grupos, sendo os Grupos 1 e 3 compostos por amostras industriais e artesanais, e o Grupo 2 apenas por cervejas industriais.

5.10.1. Agrupamento 1 – Cervejas Pilsen não alcoólicas

No grupo 1 apresentaram similaridades as cervejas ART-G e IND-D. Essas cervejas têm em comum o fato de terem menor porcentagem de álcool em relação às outras amostras, o que explica o fato de apresentarem resultados próximos entre si. Segundo o MAPA, cervejas sem álcool devem possuir graduação máxima de 0,5% v/v e cervejas com baixo teor alcoólico podem apresentar teores de 0,51 a 2,0% v/v.³⁴ Desta forma, de acordo com os teores informados pelos fabricantes, essas cervejas são consideradas não alcoólicas.

Como é possível notar por meio da Figura 36, as cervejas ART-G e IND-D situaram-se na extrema direita da separação realizada pela PC1. Esse comportamento pode ser explicado pelo fato de, em geral, cervejas não alcoólicas apresentarem quantidades significativamente menores de compostos voláteis devido aos processos utilizados para realizar a desalcoholização, que pode ser de forma biológica ou física.¹²³ No método biológico, a geração de álcool é suprimida no processo fermentativo, sendo necessário o controle de todas as etapas envolvidas, do tipo de levedura e do malte utilizados. As cervejas geradas por esse processo possuem mais dulçor e forte caráter de mosto.¹²⁴

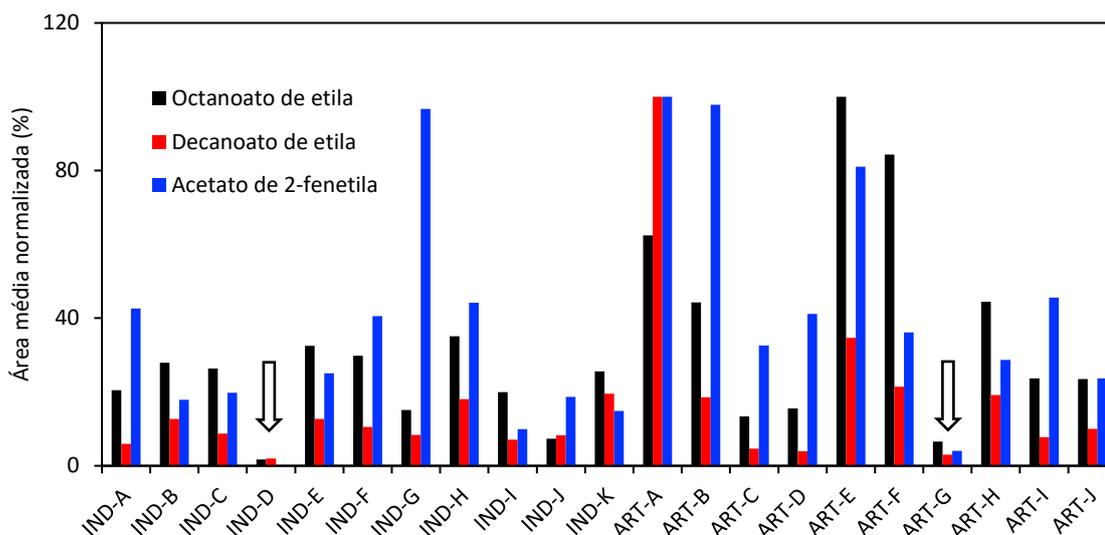
Em se tratando do método físico, o álcool é retirado do produto acabado, com a utilização de processos térmicos. Em um desses processos, a destilação à vácuo, além do álcool e do gás carbônico, outros compostos voláteis são retirados. Já na osmose reversa a redução dos compostos aromáticos é menor, devido a não utilização de calor, e aromas de pão, mosto e caramelo ainda são presentes. Quando é utilizada a diálise, por sua vez, há redução de álcoois superiores e de 65% dos ésteres.¹²⁴

Para avaliar as distinções dos voláteis perante as cervejas não alcoólicas, na Figura 37 foi plotado o gráfico das áreas médias normalizadas para os três ésteres avaliados. Por meio dela, foi possível visualizar que as menores porcentagens dos ésteres foram obtidas para as amostras não alcoólicas IND-D e ART-G, o que demonstra a perda desses analitos no processo de desalcoholização que contribui para a diferença no perfil dos voláteis obtidas para essas amostras.

Na literatura, trabalhos realizados corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho. Como exemplo, Riu-Aumatell e colaboradores (2014) avaliaram os perfis de voláteis em cervejas industriais com baixo teor alcoólico por HS-SPME-GC-MS em comparação com cervejas alcoólicas. Como resultados, as cervejas alcólicas apresentaram uma maior quantidade de álcoois superiores, ésteres e ácidos orgânicos. As cervejas com baixo teor alcoólico, por sua vez, apresentaram quantidades mais altas de pirazinas e furanos, compostos

provenientes da reação de *Maillard* que ocorre durante a torrefação do malte. O estudo complementou que, devido à fermentação limitada, compostos que podem gerar aromas e sabores desagradáveis, como aldeídos e cetonas, são insuficientemente reduzidos durante a fabricação da cerveja, sendo encontrados em maiores quantidades no produto final.¹²³

Figura 37 – Áreas médias normalizadas dos ésteres nas cervejas Pilsen analisadas. As setas indicam as cervejas sem álcool.



Outro trabalho, desenvolvido por Rettberg e colaboradores (2022), comparou cervejas Pilsen não alcoólicas provenientes de diferentes processos de desalcoholização em relação às características sensoriais e ao perfil de voláteis, utilizando-se HS-SPME e cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas com triplo quadrupolo (GC-MS/MS). Os resultados foram de que as amostras produzidas por desalcoholização física apresentaram perfis aromáticos com menores quantidades de voláteis, ao passo que as cervejas não alcoólicas produzidas com fermentação restrita se apresentaram mais doces e com forte presença de malte.¹²⁵

Embora não se tenha conhecimento de qual processo foi utilizado na produção artesanal da amostra ART-G e industrial da amostra IND-D, os resultados foram condizentes com estudos prévios para cervejas não alcoólicas.

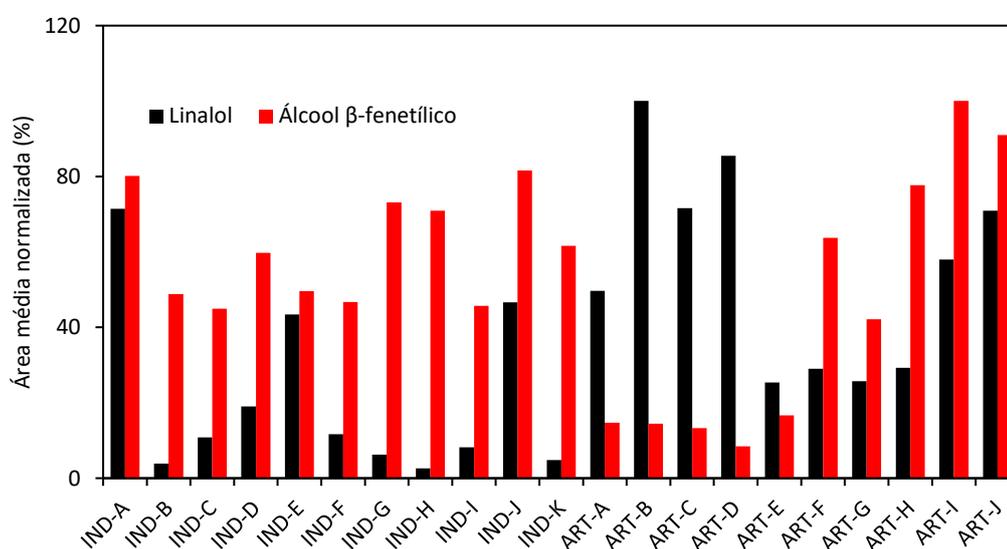
5.10.2. Agrupamento 2 – Cervejas Pilsen industriais

O Grupo 2, por sua vez, compreendeu com maior abrangência as cervejas industriais analisadas. Essas cervejas apresentaram resultados similares, mesmo em se tratando de diferentes fabricantes. O uso de parâmetros sistematicamente padronizados e similares

durante o processo de fabricação pode ter contribuído para o agrupamento das diferentes marcas de cervejas industriais.

Um fator que pode ser observado por meio do gráfico *biplot* da Figura 36 é que em relação a PC1, o agrupamento das cervejas Pilsen industriais se localizou no quadrante à esquerda, no mesmo lado do álcool β -fenetílico e no lado oposto ao linalol. Avaliando-se as áreas médias normalizadas para esses analitos, ilustradas na Figura 38, foi possível notar menores porcentagens de linalol e maiores porcentagens de álcool β -fenetílico nas cervejas industriais, o que justifica a posição dos analitos no *biplot* em relação a essas cervejas.

Figura 38 – Áreas médias normalizadas do linalol e do álcool β -fenetílico frente às cervejas Pilsen analisadas.



Com relação ao linalol, como já mencionado anteriormente, as macrocervejarias utilizam principalmente o lúpulo na forma de extrato, reportado na literatura por conter menores teores de monoterpenos se comparado aos *pellets* usualmente aplicados em cervejarias artesanais.⁵⁶ Além disso, fatores como quantidade de lúpulo utilizada e a temperatura no processo da fervura¹²⁰ podem ter contribuído para uma menor porcentagem de linalol nas cervejas industriais.

Quanto ao álcool β -fenetílico, Gianetti e colaboradores (2019) também relataram maior proeminência desse analito em cervejas industriais, apontando o composto como um marcador dos parâmetros de fermentação.¹¹⁹ Etschmann *et al.* (2022) complementaram que a produção de álcool β -fenetílico é altamente dependente da quantidade de nutrientes, que são as fontes de nitrogênio, fornecida para as leveduras.¹²⁶ Desta forma, a composição do mosto nas cervejarias industriais pode ter contribuído para uma maior síntese do álcool β -fenetílico.

5.10.3. Agrupamento 3 – Cervejas Pilsen com baixo teor de carboidratos (*low carb*)

Em relação ao Grupo 3, houve proximidade entre os resultados das amostras ART-I, ART-H e IND-H. Essas cervejas são encontradas comercialmente como *low carb* ou *light* e contêm baixo teor de carboidratos (por volta de um terço a menos)¹²⁷ se comparadas às cervejas convencionais.

Recapitulando-se o processo de produção da cerveja, quando o malte é colocado em contato com a água sob temperatura controlada, na etapa de mosturação, ocorrem a hidratação do endosperma e a ativação de enzimas do malte. Daí em diante o amido presente no malte é convertido em compostos como maltose, glicose e dextrinas. As dextrinas são açúcares não fermentescíveis, ou seja, não são utilizados pelas leveduras e fazem parte da composição final da cerveja, contribuindo para o valor calórico da bebida.¹²⁷

Para a produção de cervejas com baixo teor de carboidrato, são utilizadas técnicas para aumentar a fermentabilidade do mosto, como a conversão enzimática das dextrinas residuais pela adição de enzimas do malte,¹²⁷ uso de enzimas desramificadoras como a glucoamilase,^{128,129} uso de leveduras altamente atenuantes¹³⁰ ou a adição direta de carboidratos altamente fermentescíveis. Cada cepa de levedura utilizada fermenta diferentes açúcares em diferentes proporções, o que afeta a doçura e o corpo da cerveja obtida.¹²⁷

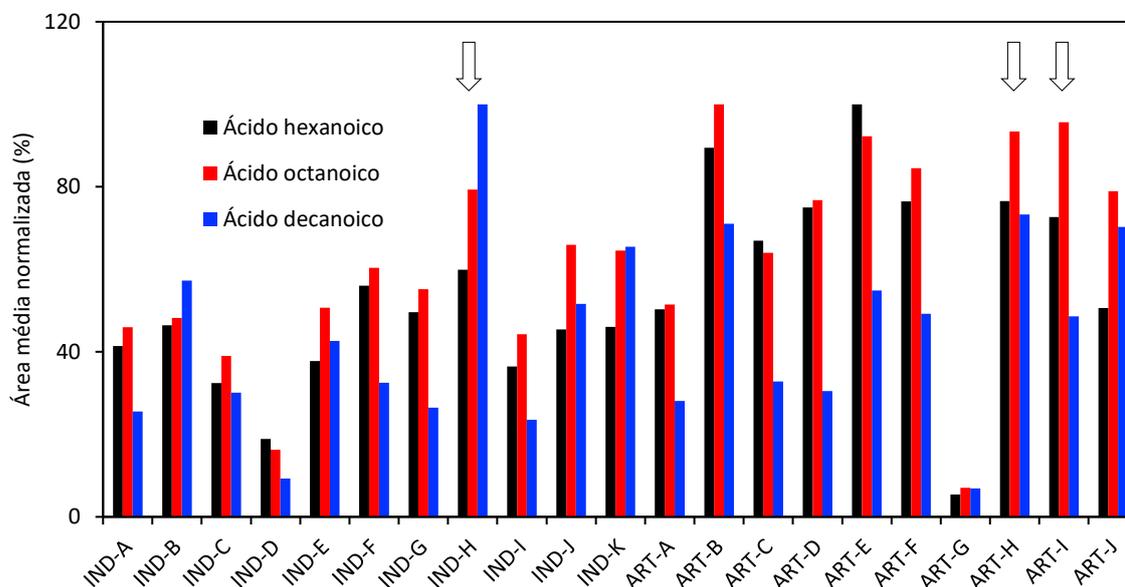
À vista disso, almejando-se comparar o perfil de voláteis de cervejas Pilsen convencionais e de cervejas dos mesmos fabricantes, porém com baixo teor de carboidratos, no trabalho de Malfliet e colaboradores (2009)¹³¹ foi utilizada a HS-SPME para avaliar aldeídos, ésteres e álcoois superiores. Os resultados obtidos foram de que as cervejas com baixo teor de carboidratos apresentaram menores quantidades de álcoois e ésteres, em comparação com as convencionais, e maiores níveis de aldeídos.

No presente estudo, pode-se perceber que o agrupamento das cervejas com baixos teores de carboidratos se localizou no mesmo quadrante dos ácidos orgânicos analisados, tais como ácido hexanoico, octanoico e decanoico. Avaliando-se as áreas médias normalizadas para esses analitos, mostradas na Figura 39, assim como para as amostras artesanais, as porcentagens dos ácidos foram maiores, com a exceção da amostra industrial IND-H.

Os ácidos orgânicos podem contribuir com o aspecto gorduroso, de queijo e de rancidez, caso estejam em concentrações acima do limiar de percepção.³¹ Esses ácidos foram identificados em maiores quantidades no final do processo de fermentação, com posterior decréscimo, no trabalho de Alves e colaboradores (2020) em que foi avaliado o perfil de

voláteis de cervejas *lager*, por HS-SPME, ao longo de cinco etapas da produção da bebida. Dentre os ácidos mais abundantes, o ácido octanoico e hexanoico foram citados.¹¹⁷

Figura 39 – Áreas médias normalizadas para os ácidos orgânicos nas às cervejas Pilsen analisadas.



Porém, não foram encontrados na literatura trabalhos que estudaram a presença com maior proeminência desses ácidos em cervejas de baixo teor de carboidrato. No entanto, a cepa de levedura escolhida e o protocolo de fermentação utilizado afetam a identidade e a quantidade de ácidos orgânicos gerados durante o processo de fermentação.⁶ A existência do agrupamento desses compostos pode ter sido, então, por métodos de fabricação similares.

5.10.4. Cervejas Pilsen artesanais

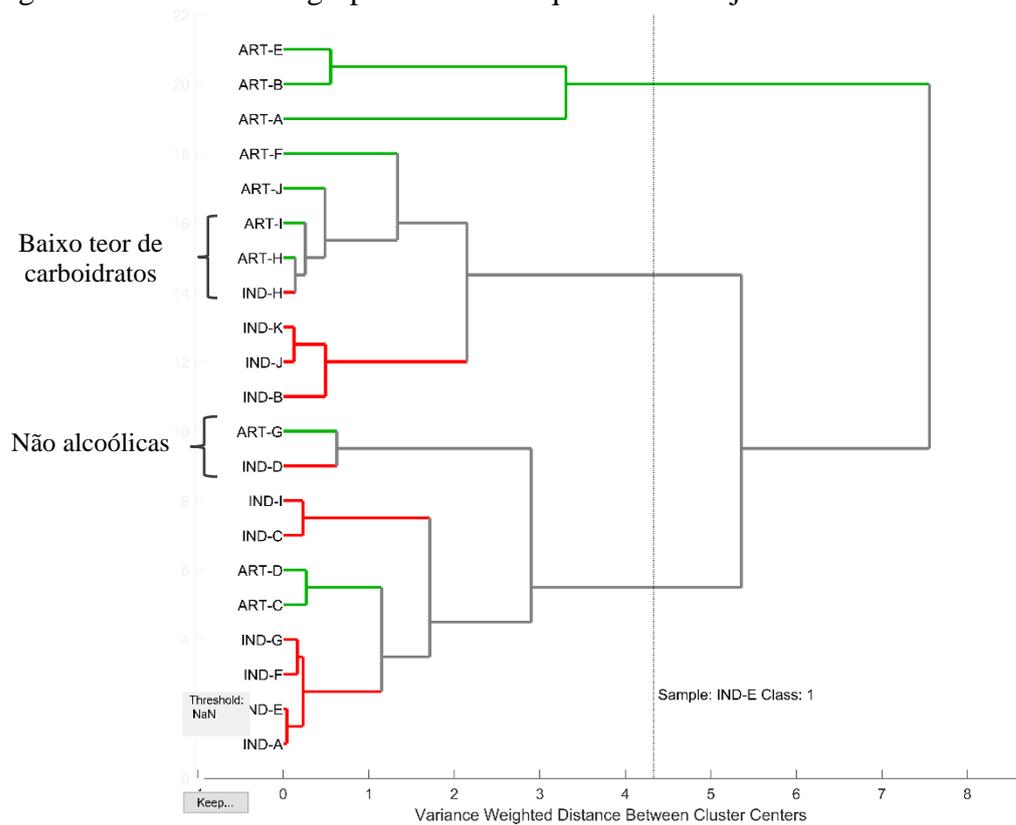
Observando-se a Figura 36, pode-se perceber que as cervejas artesanais que não se enquadraram nos agrupamentos anteriormente mencionados (não alcoólicas e de baixo teor de carboidrato) apresentaram-se dispersas ao longo dos quadrantes da PCA. Essa variabilidade entre amostras pode ser advinda das especificidades de cada cerveja, como a origem do cereal utilizado, a proporção de malte utilizada na formulação e a cepa de levedura. Além disso, as condições do processo, como tempo, temperatura, uso ou não de coadjuvantes e quantidade de cerveja produzida podem variar entre fabricantes.¹¹³ Essa possível variação de matérias-primas e diferenças durante o processo cervejeiro contribuem para explicar a discrepância entre as amostras.⁵⁵

Na PCA realizada neste trabalho, as cervejas ART-A, ART-B e ART-E localizaram-se no gráfico *biplot* mais próximas ao grupo dos ésteres, compostos que conferem à cerveja um aspecto floral e frutado marcante, resultado que já foi reportado na literatura para cervejas

artesanais.^{55,100,119} Essas cervejas já foram premiadas em concursos cervejeiros e o perfil de voláteis distinto em comparação com as outras pode ter alto impacto na preferência dos consumidores.

Para compreender melhor os agrupamentos naturais entre as amostras artesanais perante as industriais, a análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi realizada. O dendrograma obtido é mostrado na Figura 40.

Figura 40 – Análise de agrupamento hierárquico de cervejas Pilsen artesanais e industriais.



Por meio da Figura 40, visualmente observou-se que algumas amostras artesanais apresentaram similaridades com alguns agrupamentos já observados na PCA. Porém, como a produção artesanal para um mesmo estilo de cerveja pode apresentar diferenças em relação aos processos e matérias-primas utilizados, de acordo com cada fabricante, o perfil de voláteis das cervejas também se distinguiu, como observado na HCA.

As cervejas ART-F e ART-J, por exemplo, foram similares ao grupo das cervejas de baixo teor de carboidratos, mesmo não possuindo essa especificidade. A maior presença de ácidos orgânicos pode ter sido um fator relevante para o agrupamento dessas amostras.

As cervejas ART-C e ART-D, por sua vez, agruparam-se com maior semelhança às cervejas industriais analisadas. Isso indica que o aspecto final dessas bebidas, em relação aos

voláteis avaliados, não teve grande distinção como observado para algumas amostras, e foi parecido com o que foi encontrado para amostras advindas de cervejarias de grande porte.

Os resultados obtidos reafirmam a importância da avaliação do perfil de voláteis de cervejas como parâmetro de qualidade, visto que os analitos estudados influenciam no aroma da cerveja, podem ser utilizados como monitoramento do metabolismo da levedura e impactam no sabor do produto final,⁵⁵ estando associado à aceitação e popularização entre consumidores.

5.11. Análises físico-químicas

A partir das análises físico-químicas realizadas, foram obtidos os teores alcoólicos para cada amostra e o extrato aparente, que foi convertido em valor de densidade. Os dados estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros físico-químicos obtidos para as amostras de cerveja Pilsen analisadas.

Amostra	Teor alcoólico medido (% v/v)	Extrato aparente (°P)	Densidade (g/mL)
ART-A	4,6	1,9	1,0076
ART-B	5,1	2,0	1,0080
ART-C	4,1	2,1	1,0084
ART-D	5,0	2,5	1,0100
ART-E	4,2	1,8	1,0072
ART-F	4,9	2,4	1,0096
ART-G	0,3	5,7	1,0228
ART-H	4,7	-0,3	0,9988
ART-I	4,5	-0,5	0,9980
ART-J	4,3	1,5	1,0060
IND-A	5,0	1,8	1,0072
IND-B	4,5	2,5	1,0100
IND-C	4,6	2,4	1,0096
IND-D	0,3	6,1	1,0244
IND-E	5,0	1,7	1,0068
IND-F	5,5	1,5	1,0060
IND-G	4,6	2,5	1,0100
IND-H	3,4	-0,3	0,9988
IND-I	4,5	1,8	1,0072
IND-J	5,2	1,9	1,0076
IND-K	5,1	1,8	1,0072

Avaliando-se a Tabela 8 foi possível notar que para as amostras ART-H, ARTI-I e IND-H o valor do extrato aparente foi negativo e a densidade, por consequência, foi menor do que um. O extrato está relacionado a quantidade de sólidos e açúcares na cerveja após a fermentação, ou seja, considerando a presença do álcool.¹³² Como essas cervejas possuem baixo teor de carboidratos, era esperado um menor extrato aparente em comparação com cervejas tradicionais.

Com relação os teores alcoólicos, as cervejas ART-G e IND-D apresentaram teor menor do que 0,5%, o que confirmou o enquadramento na categoria de cervejas não alcoólicas.³⁴ Essas cervejas apresentaram densidades maiores que as demais, o que indica maior presença de açúcares remanescentes.

Para as demais cervejas, os teores alcoólicos medidos apresentaram valores próximos dos informados nos rótulos, com variação máxima de 0,5 para mais ou para menos.

6 CONCLUSÕES

A utilização da HS-PME em cervejas Pilsen se mostrou eficaz na extração e pré-concentração dos compostos voláteis nas amostras artesanais e industriais. Para a realização dos experimentos, a otimização da separação foi importante para garantir as condições mais adequadas para a maior parte dos analitos e foi possível obter uma separação eficaz entre os picos mesmo se tratando de um GC-MS convencional.

Com relação aos parâmetros de extração da HS-SPME, o planejamento BBD apresentou grande importância ao correlacionar os efeitos entre os níveis e os fatores estudados, bem como os efeitos de interação entre os fatores, gerando também as superfícies de resposta que foram importantes para a análise visual das regiões de melhores respostas para cada analito.

Além dos fatores avaliados no planejamento BBD, o estudo do tempo de dessorção da fibra foi fundamental para garantir a efetiva dessorção dos analitos e evitar efeitos memórias em corridas posteriores. Mesmo com a otimização dessa variável, as amostras apresentaram coeficientes de variação que variaram de 3% a 45%, de acordo com cada analito, o que indica que pode acontecer efeito de matriz e pode também ter relação com a afinidade entre o material da fibra e os analitos avaliados. Embora a maior parte dos trabalhos que analisaram cervejas por HS-SPME tenham utilizado fibras mistas, compostas por dois ou mais tipos de polímeros, a fibra PA se mostrou satisfatoriamente eficaz para a extração dos compostos das cervejas, com exceção de dois analitos: acetato de isoamila e 1-hexanol.

As análises PCA e HCA possibilitaram o agrupamento das amostras, de acordo com suas similaridades. Foram obtidos agrupamentos para amostras não-alcóolicas, de baixo teor de carboidratos e industriais, enquanto as artesanais apresentaram-se dispersas ao longo do gráfico *biplot* da PCA. As variações observadas podem ser advindas de diversos parâmetros do processo como temperatura e tempo de fermentação, cepa de levedura utilizada, as etapas do processo de produção da cerveja e o tipo de matéria-prima.

Visualizando-se a HCA, a maior parte das cervejas artesanais foram agrupadas com maior proximidade em relação a outras amostras artesanais e apenas três amostras industriais agruparam-se com maior afinidade entre si. Algumas dessas cervejas localizaram-se no gráfico *biplot* próximas ao grupo de ésteres, compostos responsáveis pelo aspecto floral e frutado na bebida, o que pode explicar as premiações que essas amostras já receberam e sua diferenciação em relação às demais.

Como perspectivas futuras, pode-se realizar a análise quantitativa dos compostos voláteis nas cervejas Pilsen, a avaliação do uso de mais de um padrão interno, o estudo da influência da diluição inicial da cerveja no efeito de matriz e testes utilizando-se outras fibras.

REFERÊNCIAS

1. Hornsey, I. S. *A history of beer and brewing*. (RSC Paperbacks, 2003).
2. Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja (SINDICERV). O setor em números. <https://www.sindicerv.com.br/o-setor-em-numeros/> (2023).
3. Dalmoro, M. & Fell, G. Dimensões artesanal e massificada na construção do mercado cervejeiro. *Rev. Adm. Empres.* **60**, 47–58 (2020).
4. Aquilani, B., Laureti, T., Poponi, S. & Secondi, L. Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. *Food Qual. Prefer.* **41**, 214–224 (2015).
5. Kunze, W. *Technology brewing and malting*. (VLB Berlin, 2004).
6. Anderson, H. E., Santos, I. C., Hildenbrand, Z. L. & Schug, K. A. A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Anal. Chim. Acta* **1085**, 1–20 (2019).
7. Li, H., Liu, F., Kun-Farkas, G. & Kiss, Z. Quantitative analysis of flavor volatiles in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detection (HS-SPME-GC-FID). *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **73**, 261–265 (2015).
8. Zhou, Z. *et al.* Development of a rapid method for determination of main higher alcohols in fermented alcoholic beverages based on dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Anal. Methods* **13**, 591–600 (2020).
9. Zhang, Z. & Pawliszyn, J. Headspace solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* **65**, 1843–1852 (1993).
10. Martins, C. S. M. Perfis metabólicos voláteis em leveduras e cervejas: avanços na compreensão do aroma da cerveja lager. (Universidade de Aveiro, 2018).
11. Pereira, C. C. B., Murakami, P. S. K., Bresolin, I. T. L. & Braga, A. R. C. Quality control of small and large-scale brewed beers. *Brazilian Appl. Sci. Rev.* **4**, 2135–2146 (2020).
12. Liu, L. *et al.* Fermented beverage and food storage in 13,000 y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: Investigating Natufian ritual feasting. *J. Archaeol. Sci. Reports* **21**, 783–793 (2018).
13. Lin, C. L. *et al.* Packing a punch: understanding how flavours are produced in lager fermentations. *FEMS Yeast Res.* **21**, 1–14 (2021).
14. Hutzler, M., Morrissey, J. P., Laus, A., Meussdoerffer, F. & Zarnkow, M. A new hypothesis for the origin of the lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *FEMS Yeast Res.* **23**, 1–17 (2023).
15. D. Junior, A. A., Vieira, A. G. & Ferreira, T. P. Processo de produção de cerveja. *Rev. Process. Químicos* **3**, 61–71 (2009).
16. Kremer Cervejaria. Tipos e estilos de cerveja. <https://kremercervejaria.com.br/blog/tipos-e->

- estilos-de-cerveja/ (2022).
17. Dutra, V. L. M. Descrição de cervejas tipo Pilsen por métodos sensoriais rápidos e análises físico-químicas. (Universidade Federal de Minas Gerais, 2019).
 18. Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. & Lima, U. de A. *Biotecnologia industrial v 4: biotecnologia na produção de alimentos*. (Edgard Blücher LTDA, 2001).
 19. Carvalho, D. O., Gonçalves, L. M. & Guido, L. F. Overall antioxidant properties of malt and how they are influenced by the individual constituents of barley and the malting process. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **15**, 927–943 (2016).
 20. American Society of Brewing Chemists. ASBC beer flavor database. (2009).
 21. Rettberg, N., Biendl, M. & Garbe, L. A. Hop aroma and hoppy beer flavor: Chemical backgrounds and analytical tools - A review. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **76**, 1–20 (2018).
 22. Madigan, M. T. et al. *Microbiologia de Brock*. (Artmed, 2016).
 23. Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. (Artmed, 2014).
 24. Deken, R. H. The Crabtree effect: A regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 149–156 (1966).
 25. Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B. & Verstrepen, K. J. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, S95–S128 (2017).
 26. Barth, R. *The chemistry of beer: science in the suds*. (Wiley, 2013).
 27. Kobayashi, M., Shimizu, H. & Shioya, S. Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* **106**, 317–323 (2008).
 28. Nešpor, J., Karabín, M., Hanko, V. & Dostálek, P. Application of response surface design to optimise the chromatographic analysis of volatile compounds in beer. *J. Inst. Brew.* **124**, 244–253 (2018).
 29. Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P. & Pillay, B. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *J. Inst. Brew.* **123**, 13–23 (2017).
 30. Tan, Y. & Siebert, K. J. Quantitative structure-activity relationship modeling of alcohol, ester, aldehyde, and ketone flavor thresholds in beer from molecular features. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3057–3064 (2004).
 31. Siebert, K. J. Modeling the flavor thresholds of organic acids in beer as a function of their molecular properties. *Food Qual. Prefer.* **10**, 129–137 (1999).
 32. Flores, A. B., Gräff, A., Cornelius, E., Fernanda, C. & De Souza, V. Perfil sensorial e avaliações físico-químicas de cerveja artesanal de chocolate e caramelo. *Rev. Destaques Acadêmicos* **7**, 158–166 (2015).
 33. Ministério da Agricultura e Pecuária e Abastecimento. *Decreto nº 9902 de 8 de julho de 2019*. (Diário Oficial da União, 2019).

34. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. *Instrução normativa nº 65 de 10 de dezembro de 2019*. (Diário Oficial da União, 2019).
35. Ministério da Agricultura e Pecuária. Anuário da cerveja 2022. 44 (2023).
36. Kleinová, J. & Klejdus, B. Determination of volatiles in beer using solid-phase microextraction in combination with gas chromatography/mass spectrometry. *Czech J. Food Sci.* **32**, 241–248 (2014).
37. American Society of Brewing Chemists. Brewers association beer style guidelines. <https://www.brewersassociation.org/edu/brewers-association-beer-style-guidelines/#80> (2023).
38. Beer Judge Certification Program. Beer style guidelines. <https://www.bjcp.org/beer-styles/beer-style-guidelines/> (2023).
39. Ligiero, C. B. P., Dos Reis, L. A., Parrilha, G. L., Filho, M. B. & Canela, M. C. Comparison of quantification methods in gas chromatography: An experiment for chemistry courses. *Quim. Nova* **32**, 1338–1341 (2009).
40. Vanbeneden, N., Delvaux, F. & Delvaux, F. R. Determination of hydroxycinnamic acids and volatile phenols in wort and beer by isocratic high-performance liquid chromatography using electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* **1136**, 237–242 (2006).
41. Lachenmeier, D. W. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chem.* **101**, 825–832 (2007).
42. Skoog, et al. *Fundamentos de química analítica*. (Thomson, 2006).
43. Ševčík, J. *Detectors in gas chromatography*. (Elsevier Scientific Publishing Company, 1976).
44. Pinho, O., Ferreira, I. M. P. L. V. O. & Santos, L. H. M. L. M. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. *J. Chromatogr. A* **1121**, 145–153 (2006).
45. Vergilio, J., Claus, T., Santos Jr, O. O., Rovigatti Chiavelli, L. U. & Ara, S. Analytical aspects of the flame ionization detection in comparison with mass spectrometry with emphasis on fatty acids and their esters. *Adv. Gas Chromatogr.* (2014) doi:10.5772/57333.
46. Da Silva, G. C. et al. Method development by GC-ECD and HS-SPME-GC-MS for beer volatile analysis. *Food Chem.* **167**, 71–77 (2015).
47. Jeong, J. H., Cha, J. & Lee, K. G. Validation of analytical method for α -dicarbonyl compounds using gas chromatography–nitrogen phosphorous detector and their levels in alcoholic beverages. *Int. J. Food Sci. Technol.* **52**, 1491–1497 (2017).
48. Nascimento, R. F., Lima, A. C. A., Barbosa, P. G. A. & Silva, V. P. A. *Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos*. (Imprensa Universitária UFC, 2018).
49. Zanella, D. et al. Comparison of headspace solid-phase microextraction high capacity fiber coatings based on dual mass spectrometric and broadband vacuum ultraviolet absorption detection for untargeted analysis of beer volatiles using gas chromatography. *Anal. Chim. Acta*

- 1141**, 91–99 (2021).
50. Campillo, N., Peñalver, R., López-García, I. & Hernández-Córdoba, M. Headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile organic sulphur and selenium compounds in beers, wines and spirits using gas chromatography and atomic emission detection. *J. Chromatogr. A* **1216**, 6735–6740 (2009).
 51. Li, G., Wu, D., Xie, W., Zhang, X. & Liu, B. Evaluation of compound-independent calibration using gas chromatography with atomic emission detection. *Talanta* **95**, 36–41 (2012).
 52. Kerpes, R., Göller, F., Kollmannsberger, H. & Becker, T. Aroma profile of a gluten-free barley malt beer crafted to remove gluten using a barley malt extract with high peptidase activity. *Eur. Food Res. Technol.* **249**, 23–32 (2023).
 53. Song, H. & Liu, J. GC-O-MS technique and its applications in food flavor analysis. *Food Res. Int.* **114**, 187–198 (2018).
 54. Stefanuto, P. H. *et al.* Advanced method optimization for volatile aroma profiling of beer using two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1507**, 45–52 (2017).
 55. Martins, C., Brandão, T., Almeida, A. & Rocha, S. M. Enlarging knowledge on lager beer volatile metabolites using multidimensional gas chromatography. *Foods* **9**, 1–22 (2020).
 56. Martins, C., Brandão, T., Almeida, A. & Rocha, S. M. Unveiling the lager beer volatile terpenic compounds. *Food Res. Int.* **114**, 199–207 (2018).
 57. Priddy, S. A., Hanley, T. R. & Effler, W. T. Separation optimization for the recovery of phenyl ethyl alcohol. *Appl. Biochem. Biotechnol. - Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* **77–79**, 473–484 (1999).
 58. Liao, P. H., Yang, H. H., Wu, P. C., Abu Bakar, N. H. & Urban, P. L. On-Line coupling of simultaneous distillation-extraction using the Likens-Nickerson apparatus with gas chromatography. *Anal. Chem.* **92**, 1228–1235 (2020).
 59. Ceva-Antunes, P. M. N., Bizzo, H. R., Alves, S. M. & Antunes, O. A. C. Analysis of volatile compounds of taperebá (*Spondias mombin* L.) and cajá (*Spondias mombin* L.) by simultaneous distillation and extraction (SDE) and solid phase microextraction (SPME). *J. Agric. Food Chem.* **51**, 1387–1392 (2003).
 60. ČULÍK, J. *et al.* Supercritical fluid extraction - new progressive method in brewing analytics. Part II. - The options of utilizing supercritical fluid extraction to analyze sensory active substances in beer. *Kvas. Prum.* **52**, 142–147 (2006).
 61. Silva, G. F. Investigação de atividades biológicas e potencial uso de extratos das flores de *Acacia Mearnsii* obtidos por arraste a vapor e extração com fluido supercrítico. (Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2018).
 62. Van Opstaele, F., Goiris, K., De Rouck, G., Aerts, G. & De Cooman, L. Production of novel

- varietal hop aromas by supercritical fluid extraction of hop pellets. Part 1: Preparation of single variety total hop essential oils and polar hop essences. *Cerevisia* **37**, 97–108 (2013).
63. Hórák, T. *et al.* Analysis of selected esters in beer: comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction. *J. Inst. Brew.* **116**, 81–85 (2010).
 64. Ruvalcaba, J. E., Durán-Guerrero, E., Barroso, C. G. & Castro, R. Development of head space sorptive extraction method for the determination of volatile compounds in beer and comparison with stir bar sorptive extraction. *Foods* **9**, (2020).
 65. Berrueta, L. A., Gallo, B. & Vicente, F. A review of solid phase extraction: basic principles and new developments. *Chromatographia* **40**, 474–483 (1995).
 66. Chen, L. *et al.* On-line coupling of solid-phase extraction to liquid chromatography - a review. *J. Chromatogr. Sci.* **47**, 614–623 (2009).
 67. Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V. & Cerdà, V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **80**, 655–667 (2016).
 68. Battistutta, F., Buiatti, S., Zenarola, C. & Zironi, R. Rapid analysis of free medium-chain fatty acids and related ethyl esters in beer using SPE and HRGC. *J. High Resolut. Chromatogr.* **17**, 662–664 (1994).
 69. Čulík, J. *et al.* Determination of aromatic alcohols in beer by solid phase extraction and detection with gas chromatography in combination with mass spectrometry (GC-MS) Part I. – Creation and validation of the analytical method. *Kvas. Prum.* **55**, 177–187 (2009).
 70. Valente, A. L. P. & Augusto, F. Microextração por fase sólida. *Quim. Nova* **23**, 523–530 (2000).
 71. Arthur, C. L. & Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* **62**, 2145–2148 (1990).
 72. Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M. & Namieśnik, J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC Trends Anal. Chem.* **73**, 19–38 (2015).
 73. Charry-Parra, G., DeJesus-Echevarria, M. & Perez, F. J. Beer volatile analysis: Optimization of HS/SPME coupled to GC/MS/FID. *J. Food Sci.* **76**, C205–C211 (2011).
 74. Sithersingh, M. J. & Snow, N. H. Headspace gas chromatography. *Gas Chromatogr.* 251–265 (2021) doi:10.1016/B978-0-12-820675-1.00012-5.
 75. Basheer, C. & Lee, H. K. Hollow fiber membrane-protected solid-phase microextraction of triazine herbicides in bovine milk and sewage sludge samples. *J. Chromatogr. A* **1047**, 189–194 (2004).
 76. Herrington, J. S., Gómez-Ríos, G. A., Myers, C., Stidsen, G. & Bell, D. S. Hunting molecules in complex matrices with SPME arrows: a Review. *Separations* **7**, 12 (2020).
 77. Pati, S. *et al.* Quantification of volatile compounds in wines by HS-SPME-GC/MS: critical issues and use of multivariate statistics in method optimization. *Processes* **9**, 662 (2021).

78. Aulakh, J. S., Malik, A. K., Kaur, V. & Schmitt-Kopplin, P. A review on solid phase micro extraction-high performance liquid chromatography (SPME-HPLC) analysis of pesticides. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **35**, 71–85 (2005).
79. Spietelun, A., Pilarczyk, M., Kloskowski, A. & Namieśnik, J. Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 4524–4537 (2010).
80. Shirey, R. E. SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. in *Handbook of Solid Phase Microextraction* 99–133 (Elsevier Inc., 2012). doi:10.1016/B978-0-12-416017-0.00004-8.
81. Schmidt, K. & Podmore, I. Solid phase microextraction (SPME) method development in analysis of volatile organic compounds (VOCs) as potential biomarkers of cancer. *J. Mol. Biomark. Diagn.* **06**, (2015).
82. Portillo-Castillo, O. J. *et al.* Developments of solid-phase microextraction fiber coatings for environmental pharmaceutical and personal care products analysis. *Rev. Anal. Chem.* **37**, 1–22 (2018).
83. Supelco. *SPME for GC analysis: getting started with solid phase microextraction. Manual técnico informativo.* <http://www.supelco.com.tw/C-01-SPME-Fiber.pdf> (2005).
84. Haftka, J. J. H., Scherpenisse, P., Jonker, M. T. O. & Hermens, J. L. M. Using polyacrylate-coated SPME fibers to quantify sorption of polar and ionic organic contaminants to dissolved organic carbon. *Environ. Sci. Technol.* **47**, 4455–4462 (2013).
85. Endo, S., Droge, S. T. J. & Goss, K.-U. Polyparameter linear free energy models for polyacrylate. *Anal. Chem.* **83**, 1394–1400 (2011).
86. Ouyang, G. & Pawliszyn, J. SPME in environmental analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 1059–1073 (2006).
87. Clark, T. J. & Bunch, J. E. Qualitative and quantitative analysis of flavor additives on tobacco products using SPME-GC-Mass spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 844–849 (1997).
88. Soria, A. C., Sanz, J. & Martínez-Castro, I. SPME followed by GC-MS: A powerful technique for qualitative analysis of honey volatiles. *Eur. Food Res. Technol.* **228**, 579–590 (2009).
89. Ebeler, S. E., Sun, G. M., Datta, M., Stremple, P. & Vickers, A. K. Solid-phase microextraction for the enantiomeric analysis of flavors in beverages. *J. AOAC Int.* **84**, 479–485 (2001).
90. Jeleń, H. H., Wlazły, K., Wąsowicz, E. & Kamiński, E. Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: comparison with static headspace method. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1469–1473 (1998).
91. de Souza, P. P., Cardeal, Z. de L., Augusti, R., Morrison, P. & Marriott, P. J. Determination of volatile compounds in Brazilian distilled cachaça by using comprehensive two-dimensional gas chromatography and effects of production pathways. *J. Chromatogr. A* **1216**, 2881–2890 (2009).
92. Kolb, B. & Ettre, L. S. *Static headspace-gas chromatography: Theory and practice.* (John

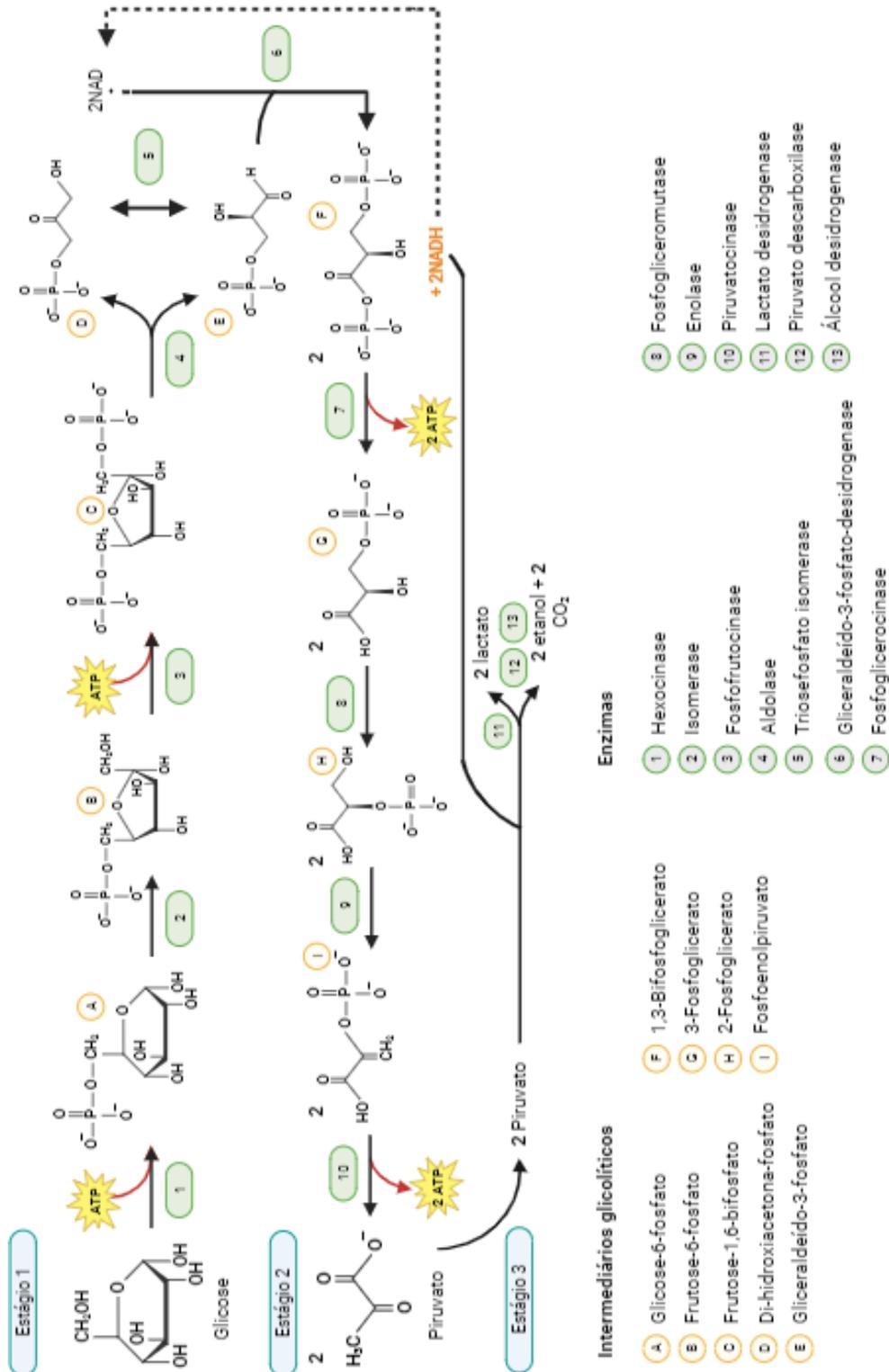
- Wiley & Sons, Inc., 2006).
93. Kudlejova, L., Risticevic, S. & Vuckovic, D. Solid-phase microextraction method development. in *Handbook of Solid Phase Microextraction* 201–250 (Elsevier Inc., 2012). doi:10.1016/B978-0-12-416017-0.00007-3.
 94. Ferreira, S. L. C. *et al.* Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Anal. Chim. Acta* **597**, 179–186 (2007).
 95. Barros Neto, B., Scarminio, I. S. & Bruns, R. E. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.* (2001).
 96. Jacyna, J., Kordalewska, M. & Markuszewski, M. J. Design of experiments in metabolomics-related studies: an overview. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **164**, 598–606 (2019).
 97. Resende, G. A. P. De. Extração assistida por campo elétrico aplicada a determinação do perfil de ácidos graxos livres de cadeia média em sidra e hidromel por LC-MS/MS. (Universidade Federal de Minas Gerais, 2019).
 98. Bro, R. & Smilde, A. K. Principal component analysis. *Anal. Methods* **6**, 2812–2831 (2014).
 99. Cserhádi, T. Data evaluation in chromatography by principal component analysis. *Biomed. Chromatogr.* **24**, 20–28 (2010).
 100. Jiao, J. *et al.* Study of chromatographic fingerprint of the flavor in beer by HS-SPME-GC. *Anal. Lett.* **44**, 648–655 (2011).
 101. Coelho, I. *et al.* Combining multielement analysis and chemometrics to trace the geographical origin of Rocha pear. *J. Food Compos. Anal.* **77**, 1–8 (2019).
 102. Palausky, J. *et al.* Headspace gas chromatography-flame ionization detector analysis for beer volatiles. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **70**, 321–323 (2012).
 103. León, M. P. Seleção de leveduras não *Saccharomyces* para produção de cervejas especiais. (Universidade Federal de Minas Gerais, 2020).
 104. Silva, G. A. da, Augusto, F. & Poppi, R. J. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC. *Food Chem.* **111**, 1057–1063 (2008).
 105. Richter, T. M., Eyres, G. T., Silcock, P. & Bremer, P. J. Comparison of four extraction methods for analysis of volatile hop-derived aroma compounds in beer. *J. Sep. Sci.* **40**, 4366–4376 (2017).
 106. Ma, C., He, Y., Cao, Y., Bai, X. & Li, H. Analysis of flavour compounds in beer with extruded sorghum as an adjunct using headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Inst. Brew.* **122**, 251–260 (2016).
 107. Rodriguez-Bencomo, J. J. *et al.* 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 Anal. Methods* **5**, 1386–1397 (2012).
 108. da Costa Fulgêncio, A. C., Resende, G. A. P., Teixeira, M. C. F., Botelho, B. G. & Sena, M. M.

- Determination of Alcohol Content in Beers of Different Styles Based on Portable Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration. *Food Anal. Methods* **15**, 307–316 (2022).
109. Andrés-Iglesias, C., Blanco, C. A., García-Serna, J., Pando, V. & Montero, O. Volatile compound profiling in commercial Lager regular beers and derived alcohol-free beers after dealcoholization by vacuum distillation. *Food Analytical Methods* vol. 9 (Food Analytical Methods, 2016).
 110. Pawliszyn, J. Chapter 13 Solid phase microextraction. in *Comprehensive Analytical Chemistry* vol. 37 389–477 (2002).
 111. Ferreira, V., Herrero, P., Zapata, J. & Escudero, A. Coping with matrix effects in headspace solid phase microextraction gas chromatography using multivariate calibration strategies. *J. Chromatogr. A* **1407**, 30–41 (2015).
 112. Burzynski-Chang, E. A. *et al.* HS-SPME-GC-MS analyses of volatiles in plant populations-quantitating compound \times individual matrix effects. *Molecules* **23**, (2018).
 113. Hernandez, K. C., Souza-Silva, É. A., Assumpção, C. F., Zini, C. A. & Welke, J. E. Matrix-compatible solid phase microextraction coating improves quantitative analysis of volatile profile throughout brewing stages. *Food Res. Int.* **123**, 75–87 (2019).
 114. Nolvachai, Y., Amaral, M. S. S., Herron, R. & Marriott, P. J. Solid phase microextraction for quantitative analysis – Expectations beyond design? *Green Anal. Chem.* **4**, (2023).
 115. Royal Society of Chemistry. ChemSpider: search and share chemistry. <http://www.chemspider.com/> (2023).
 116. Martins, C. R., Lopes, W. A. & Andrade, J. B. de. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Quim. Nova* **36**, 1248–1255 (2013).
 117. Alves, V. *et al.* Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. *Food Chem.* **326**, (2020).
 118. Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T. & Vicente, A. A. Yeast: the soul of beer's aroma - a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 1937–1949 (2014).
 119. Giannetti, V., Boccacci Mariani, M., Torrelli, P. & Marini, F. Flavour component analysis by HS-SPME/GC-MS and chemometric modeling to characterize Pilsner-style Lager craft beers. *Microchem. J.* **149**, (2019).
 120. American Society of Brewing Chemists. ASBC Hop Flavour Database. (2008).
 121. Gonçalves, J. L. *et al.* A powerful methodological approach combining headspace solid phase microextraction, mass spectrometry and multivariate analysis for profiling the volatile metabolomic pattern of beer starting raw materials. *Food Chem.* **160**, 266–280 (2014).
 122. Horák, T. *et al.* Analysis of free fatty acids in beer: comparison of solid-phase extraction, solid-phase microextraction, and stir bar sorptive extraction. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 11081–11085 (2009).

123. 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 Res. Int.* **57**, 196–202 (2014).
124. Schwarz, A. R. Produção de cervejas especiais sem álcool. 37 (2016).
125. Rettberg, N. *et al.* Effect of production technique on Pilsner-style non-alcoholic beer (NAB) chemistry and flavor. *Beverages* **8**, (2022).
126. Etschmann, M., Bluemke, W., Sell, D. & Schrader, J. Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 1–8 (2002).
127. Blanco, C. A., Caballero, I., Barrios, R. & Rojas, A. Innovations in the brewing industry: Light beer. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **65**, 655–660 (2014).
128. Hardwick, B. C. & Donley, J. R. Characterization of beer polysaccharides by enzymes and gel permeation chromatography. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **35**, 29–34 (1977).
129. Novozymes Company. Attenuzyme® Core. <https://www.novozymes.com/en/products/brewing/attenuation-control/attenuzyme-core> (2023).
130. Sakai, K., Fukui, S., Yabuuchi, S., Aoyagi, S. & Tsumura, Y. Expression of the *Saccharomyces Diastaticus* STA1 gene in brewing yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **47**, 87–91 (1989).
131. Malfliet, S., Goiris, K., Aerts, G. & de Cooman, L. Analytical-sensory determination of potential flavour deficiencies of light beers. *J. Inst. Brew.* **115**, 49–63 (2009).
132. Botelho, B. G. Perfil e teores de aminos bioativas e características físico-químicas em cervejas. (Universidade Federal de Minas Gerais, 2009).

APÊNDICE A

Por ser utilizado o plano gratuito do site Biorender para a construção das imagens e esquemas, as figuras são obtidas em baixa resolução. Dessa forma, a Figura 3 está aqui reproduzida novamente, desta vez ampliada, para possibilitar sua melhor visualização.



APÊNDICE B

A imagem mostrada na Figura 4 foi traduzida e adaptada de Dzialo e colaboradores (2017) da revista FEMS Microbiology Reviews (*doi: 10.1093/femsre/fux031*) sob licença Creative Commons CC BY 4.0 DEED. Essa licença permite a reutilização, distribuição e reprodução irrestrita dos conteúdos do artigo em qualquer meio, desde que o trabalho original esteja devidamente citado. A seguir, é mostrada a captura de tela do site da CC BY 4.0 DEED.



CC BY 4.0 DEED

Attribution 4.0 International

[See the legal code](#)

You are free to:

- Share** — copy and redistribute the material in any medium or format for any purpose, even commercially.
- Adapt** — remix, transform, and build upon the material for any purpose, even commercially.

The licensor cannot revoke these freedoms as long as you follow the license terms.

Under the following terms:

- Attribution** - You must give appropriate credit , provide a link to the license, and indicate if changes were made . You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use.
- No additional restrictions** - You may not apply legal terms or technological measures that legally restrict others from doing anything the license permits.

Notices:

You do not have to comply with the license for elements of the material in the public domain or where your use is permitted by an applicable exception or limitation .

No warranties are given. The license may not give you all of the permissions necessary for your intended use. For example, other rights such as publicity, privacy, or moral rights may limit how you use the material.

Fonte: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. Acesso em: 21 nov. 2023.

APÊNDICE C

Para fins de melhor entendimento em relação das equações apresentadas por Pawlisyn e colaboradores, um passo a passo didático foi realizado por Kolb e Etre e mostrado abaixo.⁹

A Equação 1 já mencionada anteriormente está disposta a seguir.

$$C_o V_S = C_S \cdot V_S + C_H \cdot V_H + C_F \cdot V_F \quad \text{Eq. 1}$$

Para relembrar, C_o é a concentração inicial dos analitos na solução aquosa e C_F , C_S e C_H são as concentrações em equilíbrio dos analitos na fibra, em solução aquosa e no *headspace*. Além disso, V_S , V_F e V_H são os volumes da solução, do recobrimento da fibra e do *headspace*, respectivamente.⁹ Foram consideradas também as constantes de distribuição $K_{H/S}$, entre o *headspace* e a solução (Equação 2) e $K_{F/H}$, entre a fibra e o *headspace* (Equação 3).

$$K_{H/S} = \frac{C_H}{C_S} \quad \text{Eq. 2}$$

$$K_{F/H} = \frac{C_F}{C_H} \quad \text{Eq. 3}$$

A partir das Equações 2 e 3, manipulações matemáticas simples foram realizadas para isolar as concentrações em equilíbrio na solução (Equação 2a) e no *headspace* (Equação 3a) em função das constantes de distribuição.

$$C_S = \frac{C_H}{K_{H/S}} \quad \text{Eq. 2a}$$

$$C_H = \frac{C_F}{K_{F/H}} \quad \text{Eq. 3a}$$

Substituindo-se C_H (Equação 3a) na Equação 2a, tem-se que:

$$C_S = \frac{C_F}{K_{F/H} \cdot K_{H/S}} \quad \text{Eq. 4}$$

Aplicando-se as Equações 2a e 3a na Equação 1, foi obtida a Equação 5. Além disso, considerando-se “n” como a quantidade de analito absorvido pela fibra, dada pela multiplicação entre C_F e V_F , obteve-se também a Equação 6.

$$C_o V_S = \left(\frac{C_F}{K_{F/H} \cdot K_{H/S}} \right) \cdot V_S + \left(\frac{C_F}{K_{F/H}} \right) \cdot V_H + C_F \cdot V_F \quad \text{Eq. 5}$$

$$C_F = \frac{n}{V_F} \quad \text{Eq. 6}$$

Por fim, aplicando-se a Equação 6 na Equação 5 e realizando reajustes, de modo a isolar o “n”, foi obtida a equação final mostrada por Pawlisyn

$$C_o V_S = C_F \cdot \left[\frac{V_S}{K_{F/H} \cdot K_{H/S}} + \frac{V_H}{K_{F/H}} + V_F \right] \quad \text{Eq. 5a}$$

$$C_o V_S = \left(\frac{n}{V_F} \right) \cdot \left[\frac{V_S}{K_{F/H} \cdot K_{H/S}} + \frac{V_H}{K_{F/H}} + V_F \right] \quad \text{Eq. 8*}$$

$$C_o V_S = \left(\frac{n}{V_F} \right) \cdot \left[\frac{V_S + K_{H/S} \cdot V_H + V_F \cdot K_{F/H} \cdot K_{H/S}}{K_{F/H} \cdot K_{H/S}} \right] \quad \text{Eq. 8a}$$

$$n = \frac{C_o \cdot V_S \cdot V_F \cdot K_{F/H} \cdot K_{H/S}}{V_S + K_{H/S} \cdot V_H + V_F \cdot K_{F/H} \cdot K_{H/S}} \quad \text{Eq. 9}$$

*Passou-se da Eq. 6 para Eq. 8 visto que ao longo do texto a Eq. 7 foi utilizada para denominar o cálculo do extrato aparente, na seção Metodologia.