

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Gabriel Machado Alves

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE CERVEJAS ÁCIDAS COM ADIÇÃO DE
FRUTAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO**

Belo Horizonte

2024

UFMG/ICEX/DQ. 1.617

D.878

Gabriel Machado Alves

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE CERVEJAS ÁCIDAS COM ADIÇÃO DE
FRUTAS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Química do Instituto de
Ciências Exatas da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em
Química.

Orientador: Bruno Gonçalves Botelho

Belo Horizonte

2024

Ficha Catalográfica

A474c Alves, Gabriel Machado.
2024 Caracterização química de cervejas ácidas com adição de frutas por ressonância
D magnética nuclear de hidrogênio [manuscrito] / Gabriel Machado Alves. 2024.
80 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Bruno Gonçalves Botelho.

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

Bibliografia: f. 76-80.

1. Química analítica – Teses. 2. Cerveja – Teses. 3. Ressonância magnética nuclear – Teses. 4. Ácidos orgânicos – Teses. 5. Análise de componentes principais – Teses. 6. Quimiometria – Teses. 7. Bebidas alcoólicas – Sabor e aroma – Teses. 8. Preparação de amostra (Química) – Teses. I. Botelho, Bruno Gonçalves, Orientador. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Caracterização Química de Cervejas Ácidas com Adição de Frutas por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio"

Gabriel Machado Alves

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Bruno Gonçalves Botelho - Orientador
UFMG

Prof. Ildfonso Binatti
CEFET-MG

Profa. Junia de Oliveira Alves Binatti
UFMG

Belo Horizonte, 10 de julho de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Goncalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 15/07/2024, às 12:38, 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 **Ildfonso Binatti, Usuário Externo**, em 02/08/2024, às 18:09, 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 **Júnia de Oliveira Alves Binatti, Usuário Externo**, em 02/08/2024, às 18:13, 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 **3362120** e o código CRC **A2A04346**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha companheira Elisa de Oliveira e aos meus amigos por todo o carinho e apoio durante o projeto.

Agradeço ao meu orientador Bruno Botelho, por todos os grandes ensinamentos, o empenho em ajudar, a paciência, a quem guardo muita admiração, carinho e respeito. A presença do Bruno neste projeto foi essencial.

Agradeço também aos colaboradores do projeto, ao Alan que tanto me ajudou nas discussões acerca de ressonância magnética nuclear e quimiometria e também ao Jarbas que tanto me ajudou na ressonância magnética nuclear e obtenção dos experimentos.

Gostaria de agradecer a todos os colegas do LAMS, sem dúvida o melhor grupo de pesquisa do mundo. Muito obrigado por todo o carinho e receptividade, tenho muita admiração por todos vocês, é muito bom ter um espaço de acolhimento e contribuição durante um período que nos exige tanto.

Agradeço ao departamento de Química da UFMG por todo o ensinamento gratuito e de qualidade.

Por fim agradeço a todos os professores que já tive, guardo com carinho parte de vocês em mim, a educação transforma vidas e por isso, apesar das dificuldades, me orgulho de ser professor.

“Poderoso pra mim não é aquele que descobre ouro.
Pra mim poderoso é aquele que descobre as insignificâncias
(do mundo e as nossas)
Por essa pequena sentença me elogiaram de imbecil.
Fiquei emocionado e chorei.”

Manoel de Barros

RESUMO

Este trabalho permitiu a identificação de 30 substâncias nas cervejas do tipo *sour* que possuem adição de frutas com base nos sinais dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H). Foi possível identificar o perfil de ácidos orgânicos (lático, acético, 4-aminobutírico, pirúvico, succínico cítrico, gálico e fórmico) característicos desse tipo de cerveja analisada, além de açúcares, álcoois, aminoácidos entre outros compostos característicos de cervejas tradicionais. Apenas 500 μL de cervejas *sour* previamente desgaseificadas, sem sólidos e tamponadas foram misturas com 100 μL de solução de *3-trimetilsilil-2,3,3,3-propionato- d_4 de sódio* (TSP- d_4) em D_2O para análise em um espectrômetro de RMN de 600 MHz. Os sinais espectrais obtidos foram pré tratados com os algoritmos *icoshift* e *bucketing* e foram satisfatoriamente alinhados para posterior análise quimiométrica exploratória não supervisionada (PCA). Por meio desta análise foi possível discriminar as amostras analisadas com base em seu perfil químico e também apontar quais os sinais responsáveis por discriminar as amostras analisadas. O uso da análise exploratória dos dados espectrais permitiu também observar que a discriminação dos dados ocorre sobretudo em função da classe de cervejas declaradas pelo fabricante: *sour* e *sour catharina*. Essas cervejas são discriminadas principalmente pela diferença de sinais de RMN de ^1H referentes ao ácido lático, acético, succínico, ao butan-2,3-diol, etanol e açúcares. Esses resultados demonstram que a análise quimiométrica de espectros de RMN de ^1H é uma ferramenta poderosa para caracterizar e discriminar cervejas do tipo *sour*, fornecendo uma compreensão detalhada de seus perfis químicos específicos.

Palavras-chave: ressonância magnética nuclear; cerveja *sour*; principal component analysis; cerveja *sour catharina*.

ABSTRACT

This work enable the identification of presence of 30 different organic species in sour beers with added fruits, based on the signals from Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance $^1\text{H-NMR}$ spectra.. It was possible to identify the profile of organic acids (lactic, acetic, 4-aminobutyric, pyruvic, succinic, citric, gallic, and formic) characteristic of this type of beer analyzed, in addition to sugars, alcohols, amino acids, and other compounds typical of traditional beers. Only 500 μL of previously degassed sour beers, without solids and buffered were mixed with 100 μL of *3-trimethylsilyl-2,3,3,3-propionate- d_4 sodium* (TSP- d_4) solution in D_2O for analysis in a 600 MHz NMR spectrometer. The obtained spectral signals were pre-processed with the icoshift and bucketing algorithms and were satisfactorily aligned for subsequent unsupervised exploratory chemometric analysis (PCA). Through this analysis, it was possible to discriminate the analyzed samples based on their chemical profile and also to identify which signals were responsible for discriminating the analyzed samples. The use of exploratory analysis of spectral data also allowed the observation that data discrimination mainly occurs according to the class of beers declared by the manufacturer: sour and sour Catharina. These beers are primarily discriminated by the differences in NMR signals related to lactic, acetic, succinic acid, butan-2,3-diol, ethanol, and sugars. These results demonstrate that chemometric analysis of H-NMR spectra is a powerful tool for characterizing and discriminating sour beers, providing a detailed understanding of their specific chemical profiles.

Keywords: nuclear magnetic resonance; sour beer; principal component analysis; sour Catharina beer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aumento do número de cervejarias registradas no Brasil (CERVBRASIL, 2022)	19
Figura 2 - Método convencional de produção de cerveja (Dysvik et al., 2020) (Adaptado pelo autor).....	21
Figura 3 - Método de produção de cerveja sour através de fermentação espontânea (Dysvik et al., 2020) (Adaptado pelo autor)	22
Figura 4 - Método de produção de cerveja sour através do kettle souring (Dysvik et al., 2020) (Adaptado pelo autor).....	23
Figura 5-Estados de spin para o núcleo de hidrogênio. https://chemistrytalk.org/nmr-spectroscopy/ (Adaptada)	29
Figura 6-Excitação e relaxamento nuclear. https://chemistrytalk.org/nmr-spectroscopy/ (Adaptada)	30
Figura 7-Indução de campo magnético através de corrente diamagnética Fonte: https://chemistrytalk.org/nmr-spectroscopy/ (Adaptada).....	31
Figura 8 - tabela de correlação dos deslocamentos químicos (ppm) e grupos orgânicos no espectro de RMN de hidrogênio.	31
Figura 9 - Exemplo de desdobramentos de sinais do etanol em um espectro de RMN.	32
Figura 10. Exemplo de sinais de RMN de hidrogênio desalinhados (a) e alinhados (b) através do algoritmo icoshift. Fonte: Savorani et al., 2010.....	36
Figura 11. Exemplo de espectro de RMN antes da utilização do bucketing (A) e após utilização do bucketing (B). FONTE: Sousa et al.,2013.	37
Figura 12- Foto RMN Bruker Avance 600 MHz. Disponível em: https://laremar.ufmg.br/fotos/	39
Figura 13 - Exemplo de espectro de hidrogênio na faixa de 0 ppm a 8,5 ppm da amostra 27.	41
Figura 14 - Espectro de hidrogênio da amostra 7 na faixa de 0,6 ppm a 3,1 ppm (correlação dos sinais com as espécies identificadas).....	43
Figura 15 - Espectro de hidrogênio da amostra 9 na faixa de 2,9 ppm a 5,5 ppm (correlação dos sinais com as espécies identificadas).....	48
Figura 16 - Espectro de hidrogênio da amostra 26 na faixa de 5,5 ppm a 9,5 ppm (correlação dos sinais com as espécies identificadas).....	51

Figura 17 - Sinais sobrepostos relativos ao ácido láctico antes (A) e depois (B) do tratamento de dados com o icoshift.....	56
Figura 18 - Sinais sobrepostos do ácido láctico (A) antes e (B) depois do bucketing.	57
Figura 19 - Gráfico de Variância Capturada por Componente Principal relativo ao 1º modelo PCA.	58
Figura 20 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas sours relativas ao 1º modelo PCA.....	59
Figura 21 - Gráfico de Loadings em PC1 das amostras de cervejas sours relativas ao 1º modelo PCA.....	59
Figura 22- Gráfico de Loadings em PC1 das amostras de cervejas sours relativas ao 1º modelo PCA.....	60
Figura 23 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas sours relativas ao 1º modelo PCA utilizando as classes frutas tropicais e frutas não tropicais. As amostras representadas pela cor verde são relativas àquelas com adição de frutas tropicais. As amostras representadas pela cor vermelha são relativas às amostras com adição de frutas não tropicais.....	61
Figura 24 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas sours relativas ao 1º modelo PCA utilizando as classes de cervejas com adições de mesma fruta.	62
Figura 25 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas sours relativas ao 1º modelo PCA utilizando as classes de cervejas de mesmo fabricante.....	63
Figura 26 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas sours relativas ao 1º modelo PCA utilizando as classes sour e sour catharina. As amostras representadas pela cor verde são relativas às cervejas sour catharina, e as amostras representadas pela cor vermelha são relativas às cervejas sour.....	64
Figura 27 - Gráfico de Variância Capturada por Componente Principal relativo ao 2º modelo PCA.	65
Figura 28-Gráfico de Scores das amostras de cervejas sour's relativas ao 2º modelo PCA.....	66
Figura 29 - Gráfico de Loadings em PC1 das amostras de cervejas sours relativas ao segundo modelo PCA.	66
Figura 30 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas sours relativas ao 2º modelo PCA utilizando as classes frutas tropicais e frutas não tropicais. As amostras representadas pela cor verde são relativas às amostras com adições de frutas	

tropicais. As amostras representadas pela cor vermelha são relativas às com adições de frutas não tropicais.	67
Figura 31 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas sours relativas ao 2º modelo PCA utilizando as classes de cervejas com adições de mesma fruta.	68
Figura 32 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas sours relativas ao 2º modelo PCA utilizando as classes de cervejas de mesmo fabricante.	69
Figura 33 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas sours relativas ao segundo modelo PCA utilizando as classes sour e sour catharina. As amostras representadas pela cor verde são relativas às cervejas sour catharina, e as amostras representadas pela cor vermelha são relativas às cervejas sour.	70
Figura 34 - Gráfico de Loadings em PC1 das amostras de cervejas sours relativas ao segundo modelo PCA.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Ranking e Produção mundial de cerveja (BARTHASS, 2022)	18
Tabela 2 - Produção de cervejas entre continentes (BARTHASS, 2022).....	19
Tabela 3 - Tipos de Cervejas Sour (BJCP, 2015)	24
Tabela 4 - Características cerveja sour catharina (BJCP, 2021).....	25
Tabela 5- Parâmetros de aquisição dos espectros.....	39
Tabela 6- Atribuição dos compostos identificados na faixa de 0,6 ppm a 3,1 ppm com os respectivos deslocamentos químicos, multiplicidades, constantes de acoplamento e referências da literatura.....	44
Tabela 7 - Concentração de ácidos em cervejas tradicionais reportados na literatura.	46
Tabela 8 - Atribuição dos compostos identificados na faixa de 2,9 ppm a 5,5 ppm com os respectivos deslocamentos químicos, multiplicidades, constantes de acoplamento e referências da literatura.	49
Tabela 9 - Atribuição dos compostos identificados na faixa de 5,5 ppm a 9,5 ppm com os respectivos deslocamentos químicos, multiplicidades, constantes de acoplamento e referências da literatura.	52
Tabela 10. Comparação da velocidade de metabolização de diferentes aminoácidos na produção de cervejas. Fonte: (Fontana, 2009).....	54
Tabela 11 - Cervejas sour com adição de fruta	72

LISTA DE ABREVIATURAS

pH	-	Potencial Hidrogeniônico
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
EC	-	Eletroforese Capilar
UV	-	Ultravioleta
PCA	-	<i>Principal Component Analysis</i>
TSP-d ₄	-	3-trimetilsilil-2,3,3,3-propionato-d ₄ de sódio
LAB	-	<i>Lactobacillus</i>
SAC	-	<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>
BRET-	-	<i>Brettanomyces spp.</i>
NOE	-	<i>Nuclear Overhause Effect</i>
DIL	-	Decaimento de Indução Livre
FT	-	<i>Fourier Transform</i>
LC-NMR-	-	<i>Liquid Chromatography coupled with Nuclear Magnetic Resonance</i>
GC	-	<i>Gas Chromatography</i>
MS	-	<i>Mass Spectrometry</i>
SIMCA-	-	<i>Soft Independent Modeling of Class Analogy</i>
PLS-DA-	-	<i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
HCA	-	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
MLR	-	<i>Multiple Linear Regression</i>
PCR	-	<i>Principal Component Regression</i>
PLS	-	<i>Partial Least Squares</i>
SVD	-	<i>Singular Value Decomposition</i>
Icoshift-	-	<i>Interval-Correlation-Shifting</i>
COW	-	<i>Correlation Optimized Warping</i>
DTW	-	<i>Dynamic Time Warping</i>
FW	-	<i>Fuzzy Warping</i>
coshift-	-	<i>Correlation-Shifting</i>
UV-VIS-	-	Ultravioleta-Visível
HMDB-	-	<i>Human Metabolome Database</i>
BJCP-	-	<i>Beer Judge Certification Program</i>
BA-	-	<i>Brewers Association Beer Style Guidelines</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Objetivo Geral.....	15
1.2 Objetivos Específicos	15
2. CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Cerveja	16
2.1.1 História da Cerveja.....	16
2.1.2 Legislação Brasileira	17
2.1.3 Mercado Mundial e Nacional.....	18
2.1.4 Métodos de produção de Cervejas	20
2.1.5 Guias de Estilo (BJCP e BA), Cerveja <i>Sour</i> e <i>Sour Catharina</i>	23
2.2 Ressonância Magnética Nuclear.....	27
2.2.1 Histórico	27
2.2.2 Aplicações.....	28
2.2.3 Fundamentos da RMN	28
2.3 Quimiometria	33
2.3.1 Histórico	33
2.3.2 PCA.....	34
2.3.3 Pré-processamentos	35
3. PARTE EXPERIMENTAL	38
3.1 Preparo da amostra.....	38
3.2 Análise por RMN	39
3.3 Tratamento de dados e construção do Modelo PCA	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Análise de perfil químico	41

4.2	Análise de perfil químico de 0,6 ppm a 3,1 ppm.....	43
4.3	Análise de perfil químico de 3,2 ppm a 5,5 ppm.....	48
4.4	Análise de perfil químico de 5,5 ppm a 9,5 ppm.....	51
4.5	Modelos Quimiométricos	55
4.5.1	Tratamento dos dados de RMN	55
4.5.2	Análise PCA	57
4.5.3	1º Modelo PCA.....	58
4.5.4	2º Modelo PCA.....	65
5.	CONCLUSÕES	75

REFERÊNCIAS

1. INTRODUÇÃO

Embora as cervejas *sour* possuam diversas origens e formas de produção, essas cervejas são conhecidas pelo alto teor de ácidos orgânicos, dentre eles o ácido láctico e acético, o que confere a esse tipo de cerveja menores valores de *pH* (potencial hidrogeniônico), em torno de 3,0 a 3,9, quando comparados às cervejas tradicionais, *pH* em torno de 4,5, além de características sensoriais do sabor azedo, o que explica a origem do nome *sour* (do inglês azedo) (Tonsmeire, 2014). O elevado teor desses ácidos orgânicos origina-se principalmente da fermentação de vários microrganismos, como leveduras e bactérias (Van Oevelen et al., 1977).

As cervejas *sour* englobam diversos estilos, dentro eles as cervejas *Berliner Weisse* e *Gose* de origem alemã, *Flanders Red Ale*, *Oud Bruin*, *Lambic*, *Gueuze*, *Fruit Lambic*, de origem belga, *Brett Beer*, *Mixed-Fermentation Sour Beer* de origem americana e *Catharina Sour*, sendo esta última desenvolvida no Brasil, no estado de Santa Catarina, e reconhecida como um estilo próprio de cerveja em 2015 (BJCP, 2015).

Alguns estilos de cervejas *sour* permitem ou necessariamente requerem adição de frutas em sua produção e essa adição de fruta é feita após a fermentação, já que são desejáveis traços de frutas frescas e não cozidas (BJCP, 2015).

Diversas técnicas analíticas são utilizadas para elucidar e também quantificar espécies químicas presentes nas cervejas, dentre elas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), eletroforese capilar (EC) com detector ultravioleta (UV) e também a Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN de ^1H) (Castellari et al, 2001; Montanari et al., 1999; Klampfl, 1999; J. E. A. Rodrigues et al., 2010). A RMN destaca-se por ser uma técnica rápida, não destrutiva e não direcionada, que utiliza uma pequena quantidade de amostra e que possibilita a elucidação e a quantificação simultânea de diversos compostos presentes nas cervejas (PAVIA et al., 2020)

A RMN de ^1H é capaz de gerar uma grande quantidade de sinais relativos às amostras analisadas e, dessa forma, a quimiometria é uma ferramenta muito útil na extração e na interpretação das informações relativas aos sinais amostrais. Dentro desse contexto, métodos exploratórios de dados, como a Principal Component Analysis (PCA), são importantes para captar a maior variância entre os dados e informações discriminantes relevantes entre as amostras analisadas (FERREIRA, 2015).

1.1 Objetivo Geral

Identificar as espécies químicas presentes nas cervejas do tipo *sour* com adição de frutas através da análise por RMN de ^1H e realizar uma análise exploratória não supervisionada com base em seu perfil químico por meio de PCA.

1.2 Objetivos Específicos

- Gerar os espectros de RMN de hidrogênio de cervejas do tipo *sour*.
- Identificar o máximo de espécies químicas presentes nas cervejas do tipo *sour* com base nos sinais espectrais gerados.
- Realizar análise exploratória quimiométrica discriminante não supervisionada (PCA) com base no perfil químico obtido visando identificar padrões e correlações entre as amostras estudadas.

2. CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Cerveja

2.1.1 História da Cerveja

A bebida alcoólica teve sua origem, muito provavelmente, na pré-história, ao acaso. É possível que o acontecimento tenha ocorrido de forma independente por vários grupos de povos nômades pré-históricos através do apodrecer de frutas, de mel velho, de cactos danificados e de tâmaras supuradas (HORNSEY, 2003).

Segundo Hornsey (2003), a cerveja teria sido descoberta há 8000 a.C, ocasionalmente, pela fermentação de cereais e, por isso, estaria ligada a antigas atividades, como a agricultura e a fabricação do pão (HORNSEY, 2003).

Alguns indícios apontam que, por volta de 6000 a.C, a produção de cerveja era uma atividade bem estabelecida na China e no Oriente Médio. Existem evidências, por meio da descoberta de potes com resquícios de bebidas fermentadas, de que o processo de fabricação de cerveja pode ter ocorrido por uma eventualidade, há cerca de 7 mil anos, ou seja, há 5000 a.C na vila neolítica de Jiah, ao norte da China, e também na Mesopotâmia, onde hoje é o Iraque. Existem registros de aproximadamente 4000 a.C. com símbolos da cerveja como moeda de troca e mercadoria, antes mesmo da invenção da roda e da escrita (MORADO, 2017).

Na produção da cerveja, tem-se como primeira etapa a absorção de água pelo grão do cereal para ocorrência de germinação e produção de enzimas que catalisam a conversão de amido em outros tipos de açúcares (mono e dissacarídeos). Este cereal, após ser seco ou torrado, é chamado de malte e possui gosto adocicado devido à quebra do amido em mono e dissacarídeos. Agricultores pré-históricos armazenavam suas colheitas em vasos e, eventualmente, durante as chuvas, os grãos teriam sido umedecidos e, depois, colocados para secar, produzindo de forma acidental o malte, que seria agradável, doce e de fácil digestão.

Após a formação do malte, a produção de cerveja passa pela geração do mosto, que consiste em uma espécie de extrato aquoso do malte. Os microrganismos presentes no ambiente poderiam iniciar o processo de fermentação do mosto, convertendo açúcares em álcool etílico e gás carbônico (MORADO, 2017).

Na Mesopotâmia, na região entre os rios Tigre e Eufrates (Iraque), uma bebida chamada *sikaru*, feita com pães de cevada germinada, era utilizada como peça fundamental na economia. No Egito Antigo, onde foi criado o primeiro grande centro produtor de cerveja, eram feitos vários tipos de cervejas com o nome de *zythum*, que eram mais populares que o vinho e o hidromel, devido a sua praticidade de fabricação e por ser uma bebida socializante. Já os gregos conheceram a cerveja através dos egípcios, pelos quais não foi bem recebida e, devido à influência do Império Romano, gerou redução de sua popularidade no império. A expansão da cerveja a partir da Mesopotâmia também teve como propagador o povo trácio, que dominavam a Trácia, Moldávia, Bulgária, Romênia, partes da Grécia, Turquia, Macedônia e Sérvia. Para esses povos a cerveja era tratada como uma bebida sagrada. Devido ao movimento migratório desse povo, acredita-se que eles influenciaram culturalmente os celtas e os germanos (MORADO, 2017)

2.1.2 Legislação Brasileira

De acordo com a instrução normativa do MAPA nº 65, de 10 de dezembro de 2019:

“Cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro” (BRASIL, 2019).

Na legislação brasileira são determinados como ingredientes obrigatórios na fabricação da cerveja água potável, malte ou seu extrato, lúpulo ou seu extrato, enquanto são opcionais adjuntos cervejeiros, ingredientes de origem animal, vegetal ou outros aptos para o consumo humano como alimento, levedura e outros microrganismos (BRASIL, 2019)

Os adjuntos cervejeiros são definidos como matérias primas que substituem o malte ou o extrato de malte na elaboração do mosto cervejeiro em até 45% em peso em relação ao extrato primitivo. Além disso, o mel e os ingredientes de origem vegetal, fontes de amido e de açúcares, aptos para o consumo humano como alimento, também são considerados adjuntos cervejeiros. Estes podem ser utilizados em uma quantidade máxima equivalente a 25% em peso em relação ao extrato primitivo. No

caso de adição de adjuntos cervejeiros, é obrigatória a apresentação desses ingredientes no rótulo.

Em relação às restrições na fabricação de cerveja e malta, fica proibida a adição de qualquer tipo de álcool, água fora das fábricas ou das plantas engarrafadoras habilitadas e edulcorantes. Além disso, existe um limite máximo de contaminantes microbiológicos, resíduos de pesticidas e demais contaminantes orgânicos e inorgânicos de acordo com os regulamentos técnicos específicos correspondentes. (BRASIL, 2019).

2.1.3 Mercado Mundial e Nacional

No período de 2020 e 2021, o Brasil ocupou a posição de terceiro maior produtor mundial de cerveja, atrás apenas da China, que ocupa o primeiro lugar, e dos Estados Unidos, que ocupa o segundo lugar (Tabela 1). A produção de cerveja nos anos de 2020 e 2021 em todos os continentes pode ser observada pela tabela 2, é possível observar comparando as duas tabelas (1 e 2) que os cinco principais produtores de cervejas do mundo (China, Estados Unidos, Brasil, México e Alemanha) foram responsáveis pela metade da produção mundial de cerveja nos anos de 2020 e 2021 (BARTHASS, 2022).

Tabela 1- Ranking e Produção mundial de cerveja (BARTHASS, 2022)

País	Ranking de Produção Mundial	Produção em 2020 (1000 hL)	Produção em 2021 (1000 hL)
China	1	344,110	359,740
Estados Unidos	2	203,813	203,565
Brasil	3	132,800	143,000
México	4	126,900	134,700
Alemanha	5	87,027	85,443

Tabela 2 - Produção de cervejas entre continentes (BARTHASS, 2022).

Continente	Produção em 2020 (1000 hL)	Produção em 2021 (1000 hL)	Aumento (%)
América	588,905	616,961	4,8
Ásia	544,417	564,059	3,6
Europa	503,227	516,488	2,6
África	131,482	141,056	7,3
Oceania	20,988	21,156	0,8

Em relação ao mercado de cerveja brasileiro, o número de cervejarias registradas no MAPA em 2021 chegou a 1549 (Figura 1), representando um aumento total de 1200% em relação ao ano de 2010, quando havia apenas 114 cervejarias registradas. No ano de 2020, 200 novas cervejarias foram registradas e apenas 34 outras cancelaram seu registro, representando um aumento de 12,0%, aumento esse inferior aos anos anteriores, principalmente em 2016, em que ocorreu o maior aumento nos últimos 20 anos (48,5%). A maior parte das cervejarias brasileiras se concentra nas regiões Sudeste e Sul (1329 cervejarias) 85,8% do total de cervejarias brasileiras, tendo como maior número de estabelecimentos registrados o estado de São Paulo (340 cervejarias) (CERVBRASIL, 2022).

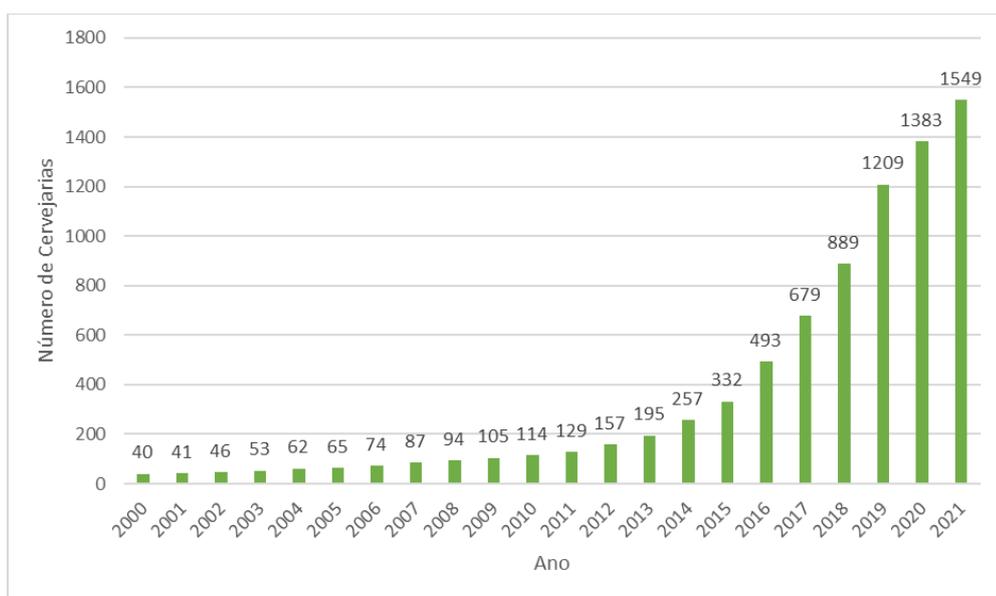


Figura 1 - Aumento do número de cervejarias registradas no Brasil (CERVBRASIL, 2022)

Das cervejarias registradas no Brasil, Santa Catarina apresenta maior densidade de todo o país (37.633 habitantes/cervejaria), seguido de Rio Grande do

Sul (40.234 habitantes/cervejaria) e Espírito Santo (72.402 habitantes/cerveja). Em média, o Brasil apresenta uma cervejaria registrada em 12,5% das cidades brasileiras.

A exportação de cerveja brasileira sofreu um grande aumento nos últimos anos, passando de 80.331.760 kg no ano de 2011 para 241.116.776 kg no ano de 2021, (aumento de 200%) e um aumento de US\$48.262.928 para US\$131.534.905 (aumento de 172,5%), em que 99% do destino da cerveja exportada é a América do Sul, principalmente Paraguai, Bolívia, Chile, Argentina e Uruguai. No mesmo período, houve redução da importação de cerveja (58,7%), o que pode ser explicado pela pandemia do Covid-19 e também pelo aumento da variedade e da quantidade de produtos nacionais, sendo 35.741 cervejas registradas e 45.984 marcas de cervejas, respectivamente (CERVBRASIL 2022).

2.1.4 Métodos de produção de Cervejas

Na produção tradicional da cerveja (figura 2), basicamente, o malte, geralmente de trigo ou de cevada, é germinado para ativação de enzimas que convertem o amido em açúcares fermentáveis. Posteriormente, o malte é moído e em seguida misturado com água em alta temperatura, processo chamado de mosturação ou brassagem. Após a etapa de mosturação, a fração insolúvel em água é separada do sistema (mosto) e a fração líquida é fervida com o lúpulo, responsável pelo amargor da cerveja. (Pires, 2015).

Em seguida o sistema é resfriado e inoculado com leveduras. As leveduras mais comumente utilizadas para fermentação de cervejas são a *Saccharomyces pastorianus*, no caso de cervejas *lagers* e *Saccharomyces cerevisiae*, no caso de cervejas *ales*. Essas leveduras são responsáveis pela transformação de carboidratos, aminoácidos, e outros nutrientes disponíveis no mosto, em etanol, dióxido de carbono, ésteres e outros compostos (Pires, 2015).

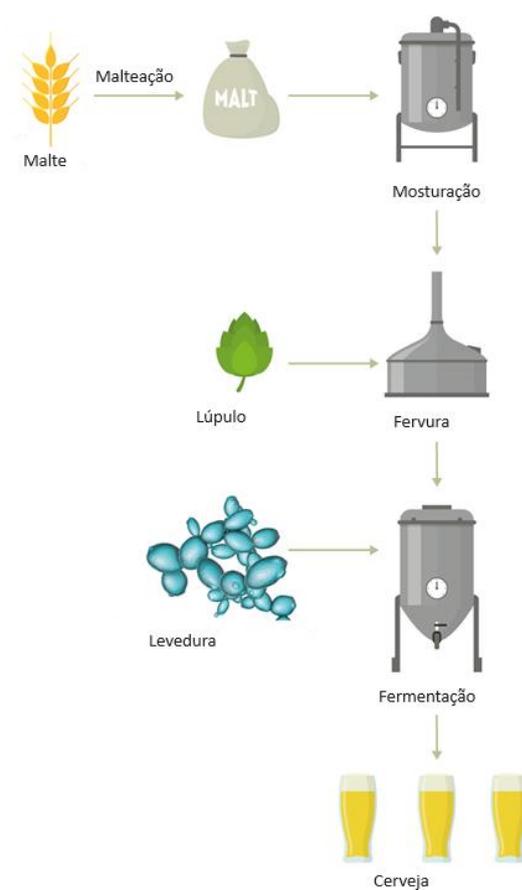


Figura 2 - Método convencional de produção de cerveja (Dysvik et al., 2020) (Adaptado pelo autor)

As cervejas *sour* tradicionais são produzidas por fermentação espontânea envolvendo diversas bactérias e leveduras, e são conhecidas por possuir gosto azedo, o que explica a origem do seu nome (*sour*, do inglês “azedo”). Seu sabor azedo se deve a diversos ácidos orgânicos, principalmente ácido acético e láctico produzidos, justificando, assim, o seu baixo valor de pH (3,0 a 3,9) quando comparado a outros tipos de cervejas (4,5 em média). (Dysvik, Leanti, et al., 2020)

Existem diversas técnicas para fermentação de cervejas do tipo *sour*, como a fermentação espontânea, fermentação mista controlada e *sour mashing* e *kettling sour*. Na fermentação espontânea (Figura 3), comumente utilizada para produção de cerveja *sour* do tipo *Lambic*, o mosto após fervura é transferido ainda quente para recipientes abertos e rasos que são deixados expostos ao ar durante a noite, geralmente no inverno, para seu resfriamento. Os microrganismos presentes no ar são inoculados naturalmente no mosto (De Roos et al., 2018) e posteriormente o mosto é transferido para barris de madeira para fermentação e maturação da cerveja, tal processo ocorre geralmente de 1 a 3 anos (Van Oevelen et al., 1977, De Roos et

al., 2018). A produção de cerveja *sour* através da fermentação espontânea enfrenta diversas desvantagens em relação a métodos atuais, como o tempo e as possíveis falhas no processo de fermentação (Spitaels et al., 2015).

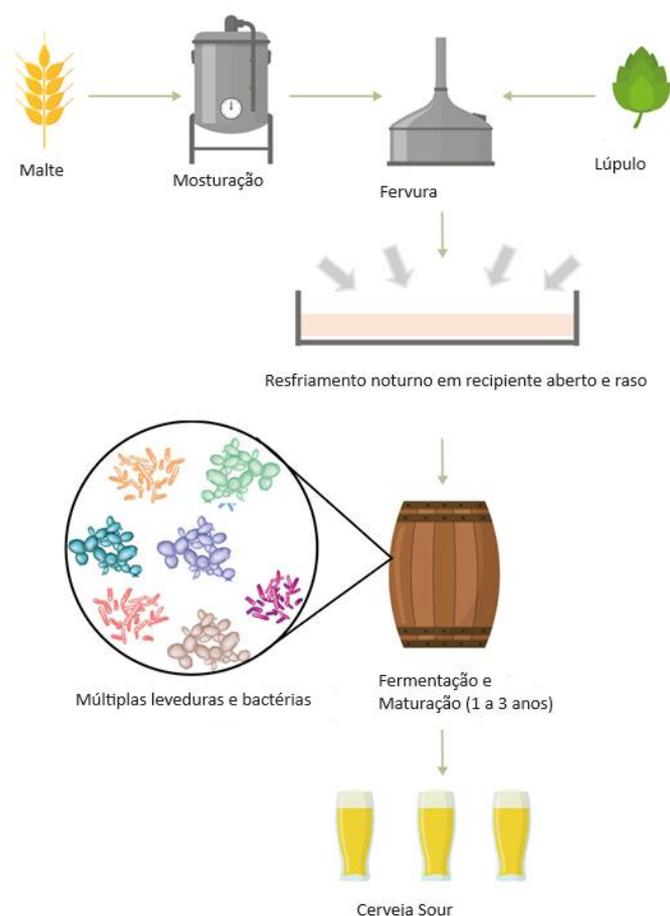


Figura 3 - Método de produção de cerveja *sour* através de fermentação espontânea (Dysvik et al., 2020) (Adaptado pelo autor)

Atualmente o método mais utilizado para produção de diversos tipos de cervejas *sour* é chamado de *kettle souring* (Figura 4), no qual a cerveja *sour* pode ser produzida em poucas semanas. Nesse método o mosto é inoculado com bactérias ácido-lácticas (LAB), que são capazes de produzir ácido láctico através da homofermentação de carboidratos (Dysvik, La Rosa, et al., 2020). A fermentação com LAB dura cerca de 24 a 48 horas, e após essa fermentação o mosto é fervido para impedir a continuidade da fermentação por LAB (Dysvik et al., 2019) e ocorre adição de lúpulo. Finalmente há a adição de levedura para fermentação alcoólica, em que os açúcares fermentáveis são convertidos em etanol e gás carbônico. Nessa etapa, as

leveduras utilizadas podem ser a SAC (*Saccharomyces Cerevisiae*) ou BRET (*Brettanomyces spp.*), a depender do tipo de cerveja *sour* produzida.

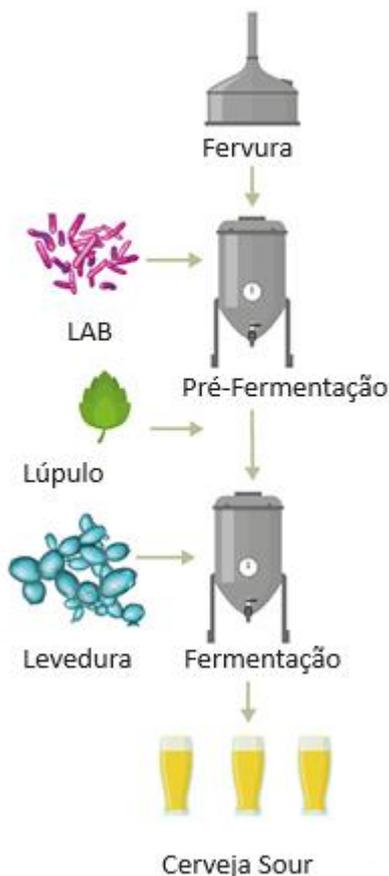


Figura 4 - Método de produção de cerveja *sour* através do *kettle souring* (Dysvik et al., 2020) (Adaptado pelo autor)

2.1.5 Guias de Estilo Beer Judge Certification Program (BJCP) Brewers Association Beer Style Guidelines (BA), Cerveja *Sour* e *Sour Catharina*

De acordo com o guia de estilos de cervejas 2021, as cervejas *sour* podem ser de vários estilos diferentes e, conseqüentemente, usam matérias primas e métodos diversos em sua produção, o que certamente estará relacionado ao perfil químico dessas cervejas (Mitchell & Strong, n.d.).

A tabela 3 abaixo é uma síntese das cervejas *sour*, sua origem e que permitem adição de frutas. É importante observar que nem toda cerveja *sour* permite a adição de frutas, assim como cervejas com adições de frutas não são, necessariamente, do estilo *sour*.

Tabela 3 - Tipos de Cervejas *Sour* (BJCP, 2015)

Tipos de Cervejas	Origem	Permite adição de fruta?	É do tipo <i>sour</i>?
<i>Berliner Weisse</i>	Alemã	Sim	Sim
<i>Gose</i>	Alemã	Sim	Sim
<i>Flanders Red Ale</i>	Belga	Sim	Sim
<i>Oud Bruin</i>	Belga	Sim	Sim
<i>Lambic</i>	Belga	Não	Sim
<i>Gueuze</i>	Belga	Não	Sim
<i>Fruit Lambic</i>	Belga	Sim	Sim
<i>Brett Beer</i>	Estados Unidos	Não	Sim
<i>Mixed-Fermentation Sour Beer</i>	Estados Unidos	Não	Sim
<i>Wild Specialty Beer</i>	Estados Unidos	Sim	Sim
<i>Straight Sour Beer</i>	Estados Unidos	Não	Sim
<i>Fruit Beer</i>	Variável	Sim	Às vezes
<i>Catharina Sour</i>	Brasil	Sim	Sim

Vale destacar que as cervejas *European Sour Ale*, que apresentam os tipos *Berline Weiss*, *Flanders Red Ale*, *Oud Bruin*, *Lambic*, *Gueuze* e *Fruit Lambic*, são produzidas geralmente com trigo, têm baixo amargor, acidez variável e algumas são adoçadas e saborizadas no momento de sua degustação. (BJCP, 2015)

As cervejas *sour* do tipo *Berliner Weisse*, *Gose*, *Flanders Red Ale* e *Oud Bruin*, caso tenham adição de frutas, devem ser enquadradas no estilo *Fruit Beer* de acordo com o BJCP, porém vale ressaltar que o estilo *Fruit Beer* é genérico e enquadra também outras cervejas que possuem adição de frutas, mas não são do estilo *sour* (Mitchell & Strong, n.d.).

Um fator importante que diferencia a produção dessas cervejas é a levedura utilizada. A cerveja do tipo *Catharina sour* deve utilizar necessariamente a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto as cervejas *sour* com adição de frutas do tipo

Berliner Weisse, *Gose*, *Flanders Red Ale*, *Oud Bruin* e as cervejas do tipo *Fruit Lambic* utilizam a Levedura BRET pura, BRET junto com SAC e alguns casos apenas SAC (Mitchell & Strong, n.d.).

A cerveja *Catharina sour* foi desenvolvida no Brasil, no ano de 2015, no estado de Santa Catarina, e por isso batizada como *Catharina Sour*, originada através de colaboração entre cervejeiros artesanais e elaborada com ingredientes locais e ideais para climas quentes (tabela 4). Em sua composição é utilizado comumente malte Pilsner e trigo (maltado ou não maltado), geralmente em iguais porcentagens, sua acidificação é realizada antes do processo de fervura (*Kettle souring*), geralmente por uma variedade de *Lactobacillus*, seguida por uma levedura de *ale* neutra.

A adição de frutas característica no estilo *sour* é realizada após a fermentação, já que são desejáveis traços de frutas frescas e não cozidas. Muitas vezes são adicionadas uma ou duas frutas de origem tropical (BJCP, 2015).

Tabela 4 - Características cerveja *sour* catharina (BJCP, 2021)

Impressão Geral	Leve, refrescante, ácida, baixo amargor, teor moderado de álcool, carbonatação moderadamente alta, sabor e aroma de fruta geralmente tropical
Aroma	Caráter de fruta em nível médio; Acidez láctica limpa em nível baixo a médio; Malte praticamente ausente; Caráter de fermentação limpo; Ausência de caráter aromático de lúpulo e álcool.
Aparência	Cor dependente da fruta utilizada, mas geralmente muito clara; Transparência variável entre límpida e turva dependendo da idade e da fruta utilizada; Efervescente; Colarinho médio a alto e volumoso, com boa retenção.
Sabor	Fruta fresca de nível médio a alto; Acidez láctica limpa baixa a médio-alta; Geralmente ausência de malte;

	<p>Baixo sabor de grãos ou de pão; Final seco com retrogosto limpo, azedo e frutado; Não deve apresentar qualquer sabor de lúpulos, notas acéticas, diacetil e de funky, oriundos de <i>Brettanomyces</i>.</p>
--	--

Sensação na boca	<p>Corpo leve a médio-baixo; Carbonatação média a alta; Acidez baixa a médio-alta</p>
-------------------------	---

Densidade do mosto antes da fermentação (g/mL)	1,039-1,048
---	-------------

Densidade do mosto após a fermentação (g/mL)	1,002-1,008
---	-------------

Amargor (IBU)	2-8
----------------------	-----

Cor (SRM)	2-7
------------------	-----

Teor Alcoólico (%v/v)	4.0-5.5
------------------------------	---------

Exemplos Comerciais	<p>Itajahy Catharina Araca <i>Sour</i> Blumenau <i>Catharina Sour</i> Sun of a Peach Lohn Bier <i>Catharina Sour</i> Jaboticaba Liffey Coroa Real UNIKA Tangerina Armada Daenerys</p>
----------------------------	--

2.2 Ressonância Magnética Nuclear

2.2.1 Histórico

A primeira análise por RMN da história foi realizada em 1938. No entanto, apenas em 1950, após a descoberta de que a frequência de ressonância de um núcleo depende do seu ambiente químico e de que um núcleo pode influenciar a ressonância de outros núcleos através das ligações químicas, acoplamento *spin-spin*, os químicos perceberam sua aplicação na química estrutural (Becker & Edwin D, n.d.). Ainda na década de 1950, houve uma variedade de desenvolvimentos instrumentais que forneceram recursos ainda maiores para a RMN, gerando aumento de resolução e, conseqüentemente, facilidade da visualização de acoplamentos *spin-spin*, além da possibilidade de mensurar alguns parâmetros como as constantes de acoplamento vicinais em ângulos diédricos (PAVIA et al., 2020).

Na década de 1960 introduziu-se a prática de coletar repetidamente os espectros para combiná-los, hoje conhecida como número de transientes, gerando grande ganho de sensibilidade. Houve também a descoberta e aplicação do efeito *Nuclear Overhauser Effect* (NOE), provocando aumento da relação sinal/ruído (Claridge, n.d.). Ainda nessa década, foi inserida a técnica de único pulso de radiofrequência, em que todos os núcleos magnéticos da amostra são excitados simultaneamente e, em seguida, sofrem relaxamento, liberando diferentes ondas eletromagnéticas sobrepostas, chamado de decaimento da indução livre (DIL). Através do método matemático conhecido como *Fourier Transform* (FT), as frequências liberadas são extraídas individualmente para cada núcleo magnético. (PAVIA et al., 2020).

Em 1970 ocorreram divulgações acerca da RMN bidimensional, embora a técnica só tenha sido amplamente utilizada a partir da década de 1980 devido aos avanços dos instrumentos e também dos computadores utilizados. Em 1990 houve um progresso intenso nas diferentes técnicas de pulso, gerando cada vez mais dados estruturais em menor intervalo de tempo, além do surgimento da *Liquid Chromatography coupled with Nuclear Magnetic Resonance* (LC-NMR) que apresenta grande utilidade na análise de matrizes complexas, uma vez que tal técnica é capaz de separar os compostos e em seguida gerar os seus espectros de RMN

individualmente. A partir da década de 2000, houve grandes desenvolvimentos nas sondas utilizadas, gerando maior ganho da relação sinal/ruído (Claridge, n.d.).

2.2.2 Aplicações

A RMN é uma técnica que apresenta vasto campo de aplicações, como a química de alimentos, em que pode ser utilizada como ferramenta para elucidação estrutural e quantificação de compostos orgânicos e inorgânicos, na análise de qualidade e autenticidade desses alimentos, (van Duynhoven et al., 2010), na medicina, com a obtenção de imagens anatômicas de seres humanos, nas ciências dos materiais, na análise de metabólitos em diversos tipos matrizes, entre outras aplicações. Além disso, é uma técnica indiscutivelmente fundamental na química orgânica, principalmente em elucidações estruturais (Becker & Edwin D, n.d.).

A técnica de RMN apresenta grandes vantagens quando comparada com outras técnicas analíticas, com o grande poder de elucidação estrutural de compostos, é uma prática que permite a detecção e a quantificação de diversos compostos, simultaneamente, em uma matriz em um único espectro de forma não direcionada, utilizando uma pequena quantidade de amostra. Trata-se de uma técnica não destrutiva e rápida e pode ser utilizada para detectar a autenticidade e a qualidade de produtos alimentícios (Le Gall & Colquhoun, 2003).

Porém, ao mesmo tempo, a RMN apresenta as desvantagens do custo do equipamento, a sua relativa baixa sensibilidade quando comparada com outras técnicas analíticas, como a espectrometria UV-VIS (ultravioleta-visível) ou fluorescência de raio X, por exemplo, embora a sensibilidade possa ser aumentada através de RMN de alto campo e introdução de sondas criogênicas.

2.2.3 Fundamentos da RMN

A Ressonância magnética nuclear (RMN) é um método espectroscópico em que um campo magnético (B_0) homogêneo de intensidade específica é aplicado à amostra analisada, fazendo com que os núcleos atômicos presentes na amostra, que possuem momento angular de spin I , os quais têm número atômico ou massa ímpar, sejam divididos em diferentes estados de spin. No caso da RMN de ^1H , a população de núcleos de hidrogênio é dividida em dois estados de spin: $+\frac{1}{2}$, que possui

orientação alinhada ao campo magnético (B_0) e, portanto, possui menor energia; e $-1/2$, que possui orientação contrária a B_0 e, portanto, possui maior energia (Figura 5).

O fenômeno da ressonância magnética nuclear ocorre quando um determinado núcleo, alinhado ao campo magnético externo, absorve energia eletromagnética na região de radiofrequência (RF) e, assim, muda o seu estado de spin em relação ao campo magnético (B_0) aplicado. A energia fornecida necessária para mudança do estado de spin é quantizada e corresponde exatamente à diferença de energia entre os estados de spin ($+1/2$ e $-1/2$ no caso do próton ^1H), sendo que essa energia depende da magnitude do campo magnético utilizado (B_0), e também do núcleo envolvido no processo (Claridge, n.d.).

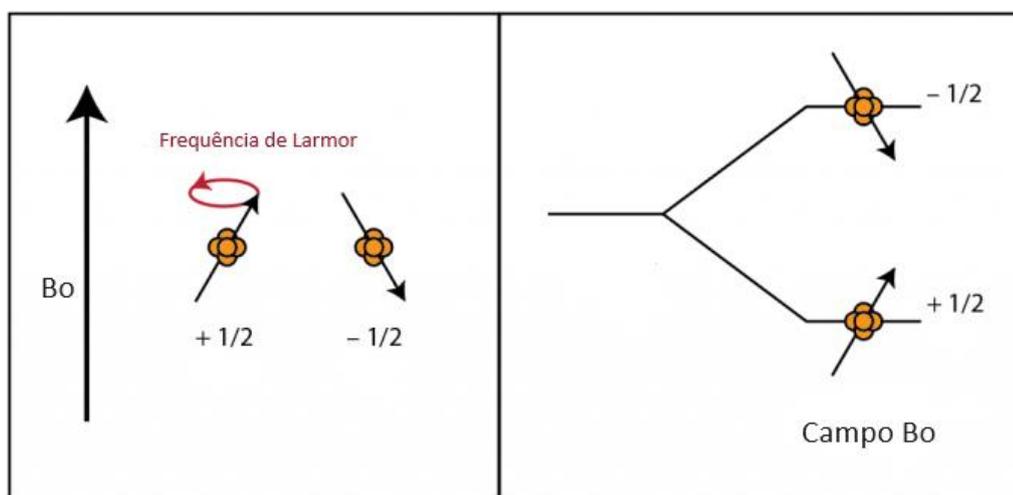


Figura 5 - Estados de spin para o núcleo de hidrogênio. <https://chemistrytalk.org/nmr-spectroscopy/> (Adaptada)

Quando um determinado campo magnético é aplicado a um núcleo de hidrogênio, por exemplo, este começa a mudar de direção, movimento geralmente associado, por analogia, ao movimento de um pião, com uma frequência chamada de frequência de Larmor, que depende da intensidade do campo. Quanto maior a intensidade do campo magnético fornecido, maior a velocidade de precessão do núcleo de hidrogênio. O movimento de precessão do núcleo gera um campo elétrico oscilatório e, caso sejam inseridas ondas radiofrequências (RF) de mesma frequência do componente de campo elétrico oscilatório, haverá absorção de energia do núcleo por ressonância, gerando assim, a mudança de estado de spin do núcleo atômico. Em seguida, o núcleo sofrerá relaxamento, liberando um conjunto de fótons de valores específicos de energias e frequências, conhecido como DIL (Figura 6), posteriormente

as frequências sobrepostas são separadas individualmente através da transformada de Fourier (FT) (PAVIA et al., 2020; SILVERSTEIN et al., 2019)

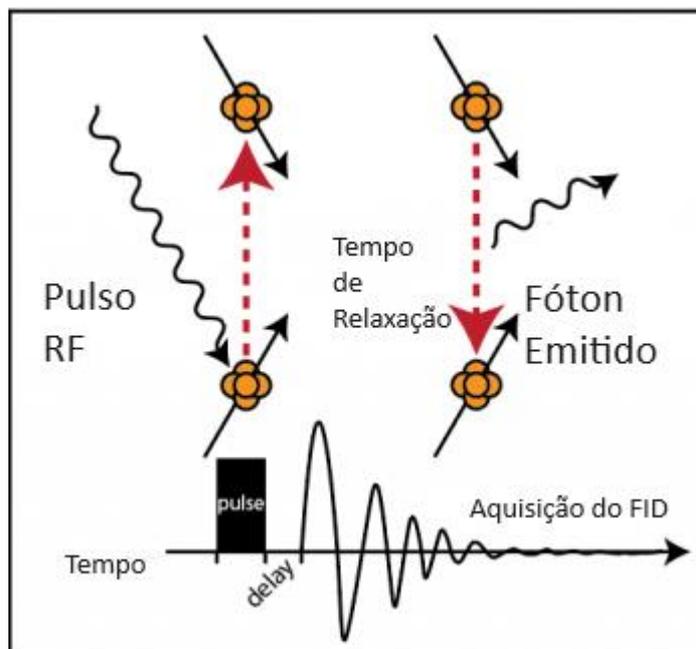


Figura 6-Excitação e relaxamento nuclear. <https://chemistrytalk.org/nmr-spectroscopy/> (Adaptada)

O movimento dos elétrons em torno do núcleo (corrente diamagnética local) induz um campo magnético contrário ao campo magnético externo aplicado à amostra (Figura 7), gerando, então, a blindagem diamagnética, que é dependente da densidade eletrônica em torno do núcleo. Esse fator é fundamental para o entendimento da análise de espectros de RMN, uma vez que cada núcleo de hidrogênio em uma espécie química está em um determinado ambiente químico, com uma blindagem eletrônica, a qual depende de inúmeros fatores estruturais dos átomos vizinhos ao hidrogênio ressonante, tais como eletronegatividade, hibridização, anisotropia magnética, por exemplo.

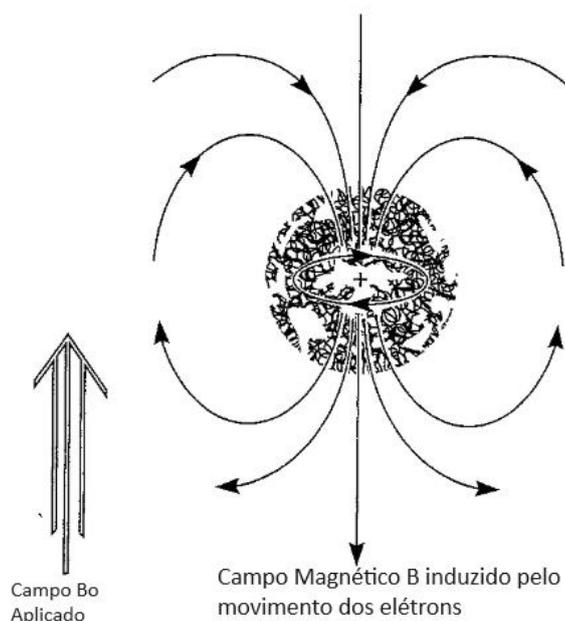


Figura 7-Indução de campo magnético através de corrente diamagnética Fonte: <https://chemistrytalk.org/nmr-spectroscopy/> Adaptada)

A blindagem eletrônica é específica para cada tipo de próton, fator determinado pelo seu ambiente químico, produzindo, assim, valores específicos de deslocamentos químicos nos espectros (δ) em partes por milhão (ppm) e informações de valores inestimáveis sobre elucidações estruturais dos compostos analisados (Figura 8).

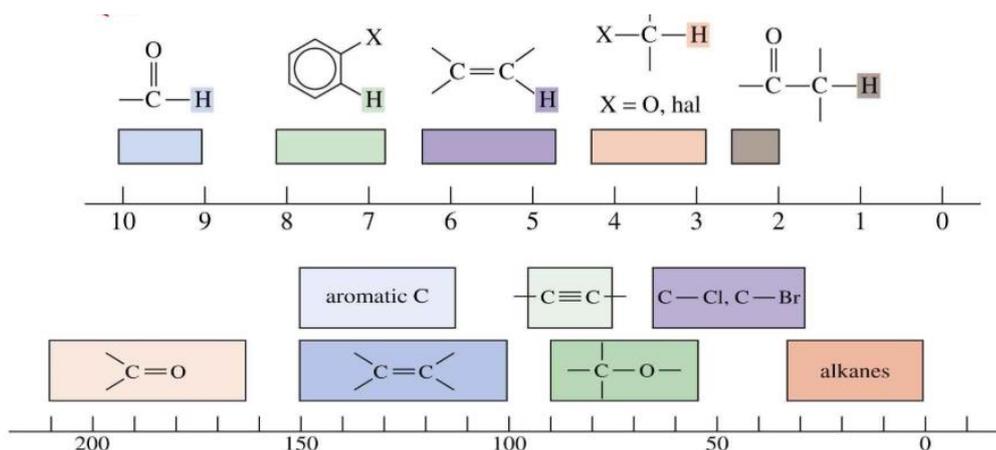


Figura 8 - tabela de correlação dos deslocamentos químicos (ppm) e grupos orgânicos no espectro de RMN de hidrogênio.

Outra informação importante promovida na RMN é derivada do fenômeno do desdobramento *spin-spin*, explicado experimentalmente pela regra $n+1$, em que cada próton em ressonância tem o seu sinal desdobrado em $n+1$ sinais, em que n representa o número de prótons ligados a carbonos próximos ao próton em ressonância. Esse fenômeno é responsável pelo padrão de desdobramento de sinais (dupletos, tripletos, quartetos e etc.) amplamente observados nos espectros de hidrogênio (Figura 9)

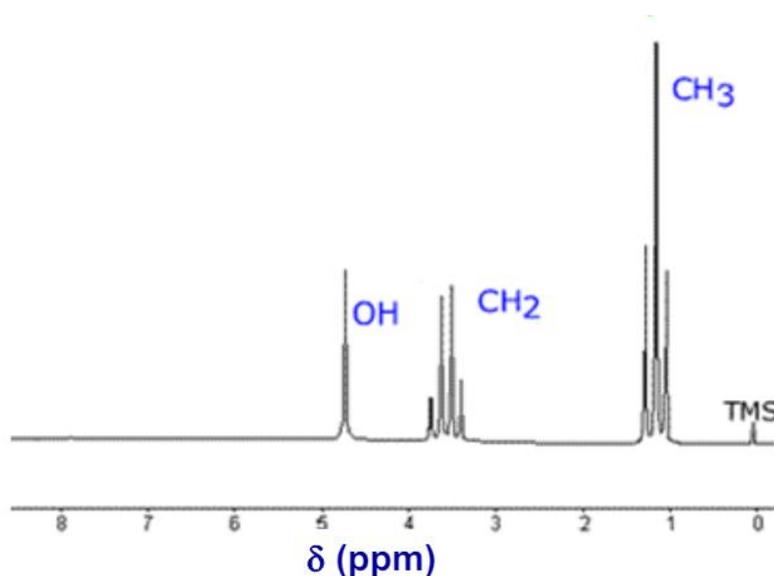


Figura 9 - Exemplo de desdobramentos de sinais do etanol em um espectro de RMN.

Dessa forma, o padrão de desdobramento *spin-spin* revela quantos hidrogênios são adjacentes ao hidrogênio analisado em uma determinada parte da estrutura. Além disso, vale ressaltar que a intensidade dos sinais é diretamente proporcional ao número de hidrogênios que geram aquele sinal, trazendo, assim, outra poderosa informação acerca da amostra analisada. (PAVIA et al., 2020; SILVERSTEIN et al., 2019).

2.3 Quimiometria

2.3.1 Histórico

A quimiometria surgiu aproximadamente em 1971 com Kowalski, Brown, Vandeginste e Svante Wold (FERREIRA, 2015) e pode ser definida como uma “aplicação de ferramentas matemáticas e estatísticas à química” (Kowalski, 1975), e como uma disciplina química que usa métodos matemáticos e estatísticos para: a) planejar ou otimizar procedimentos experimentais. b) extrair o máximo da informação química relevante, através da análise dos dados. (Kowalski, 1978).

Segundo Kowalski, em uma entrevista sobre o início da quimiometria, essa disciplina nasce da necessidade de obter mais informações de grande quantidade de dados através de instrumentos computadorizados (Geladi & Esbensen, 1990), sendo muito importante como conexão entre química e outras áreas, como matemática, estatística, ciências computacionais e biológicas.

Os instrumentos modernos, como exemplo, RMN, cromatógrafos e espectrômetros de massas, são capazes de gerar uma grande quantidade de sinais relativos a apenas uma amostra analisada. Dentro desse contexto, a quimiometria se mostra como uma poderosa ferramenta na extração e na interpretação de informações relativas aos sinais obtidos (FERREIRA, 2015).

Os modelos quimiométricos podem ser divididos em dois tipos: modelos supervisionados e modelos não supervisionados. Nos modelos supervisionados, as amostras analisadas necessariamente são provenientes de alguma classe pré-estabelecida e, inclusive, as informações sobre as classes são utilizadas durante a análise dos dados, entre os exemplos de modelos supervisionados podem ser citados: *Soft Independent Modeling of Class Analogy* (SIMCA), e *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA). Nos modelos não supervisionados, por sua vez, as informações prévias em relação às amostras não são utilizadas para classificação delas, portanto, não é necessária nenhuma informação anterior a respeito das classes e as classes são formadas naturalmente em função dos dados obtidos experimentalmente (FERREIRA, 2015).

Os métodos não supervisionados de reconhecimento de padrões são conhecidos também como métodos de análise exploratórias de dados, como por exemplo a análise de componentes principais, conhecida pela sigla PCA (do inglês

Principal Component Analysis), a análise de agrupamentos dos métodos hierárquicos, conhecido pela sigla HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*). Os modelos também podem ser divididos em modelos qualitativos – como PCA, PLS-DA, SIMCA – e modelos quantitativos, também conhecidos como calibração multivariada – como o MLR (*Multiple Linear Regression*), PCR (*Principal Component Regression*), PLS (*Partial Least Squares*), entre outros (FERREIRA, 2015)

2.3.2 PCA

A análise por componentes principais teve início em 1901 por Karl Pearson, embora o procedimento do método tivesse sido desenvolvido por Hotelling em 1933 (Pearson, 1901) (Hotelling, n.d.). A análise PCA é um método multivariado, não supervisionado, usado para projetar os dados em um espaço de dimensão reduzida, sem que as relações entre as amostras sejam afetadas. Nessa análise, a maior parte da variância entre os dados é capturada e as informações discriminantes relevantes das amostras ficam mais evidentes e mais simples de compreender (FERREIRA, 2015).

Matematicamente, a análise PCA pode ser descrita como uma decomposição de uma matriz de dados, geralmente pré-processados, chamada de $\mathbf{X}(\mathbf{I} \times \mathbf{j})$, em que \mathbf{I} representa o vetor relativo às amostras (vetor linha) e \mathbf{j} o vetor relativo às variáveis medidas (vetor coluna), em duas novas matrizes: *scores* (\mathbf{T}) e *loadings* (\mathbf{L}). Tal relação pode ser expressa como:

$$\mathbf{X} = \mathbf{T}\mathbf{L}^t$$

A matriz de scores (\mathbf{T}) representa a relação entre as amostras, enquanto a matriz de loadings (\mathbf{L}) representa a relação entre as variáveis. Essa decomposição da matriz \mathbf{X} gera uma mudança de base no espaço das variáveis originais para o espaço das componentes principais (PC) de dimensões reduzidas. A mudança de base no espaço das variáveis define novos eixos (PC), que são direções que descrevem a máxima variância dos dados das amostras, em que a primeira PC gerada pelo modelo (PC1) descreve a maior variância possível dos dados no modelo, enquanto a segunda PC (PC2) possui necessariamente direção ortogonal a PC1 e tem maior variância no subespaço de PC1. As PCs consecutivas são ortogonais às PCs anteriores e

descrevem a máxima variância, uma a uma, dentro dos subespaços das PCs anteriores (FERREIRA, 2015) (OTTO, 2007).

Existem diversas maneiras para calcular as matrizes de *scores* e *loadings*, embora o método de decomposição por valores singulares, *singular value decomposition* (SVD) seja um dos mais utilizados na Química. Nesse método a matriz **X** é decomposta em três novas matrizes, representadas por **U**, **S** e **V**, que se relacionam através da equação abaixo. Nessa matriz, **US** representa a matriz de *scores* **T** e **V** representa a matriz de pesos **L** (Bro & Smilde, 2014).

$$\mathbf{X} = \mathbf{USV}^t$$

2.3.3 Pré-processamentos

Os espectros de RMN de hidrogênio necessitam de pré-processamento para garantir uma boa reprodutibilidade dos espectros quando ocorre principalmente uma grande série de medições. Dentre eles é importante o ajuste de fase dos sinais e o ajuste da linha base dos espectros, além do controle das mudanças dos deslocamentos químicos dos sinais entre amostras, que pode ser resolvido primeiramente com a calibração dos espectros em função de um padrão de referência, como o TMS ou TSP (Monakhova et al., 2013).

Mesmo com os espectros calibrados em função de um padrão adicionado, são comuns os desalinhamentos dos sinais entre os espectros de RMN analisados. Esses desalinhamentos surgem devido a vários fatores, como pH, temperatura, força iônica do meio, fatores instrumentais, entre outros, o que pode gerar erros nas interpretações dentro dos modelos Quimiométricos (Sousa et al., 2013). Dessa forma, além de padronizar ao máximo esses fatores que podem gerar erros no modelo, existem algoritmos que auxiliam na correção dos desalinhamentos, como por exemplo o *interval-correlation-shifting* (*icoshift*), *bucketing*, *correlation Optimized Warping* (*COW*), *dynamic time warping* (*DTW*), *fuzzy warping* (*FW*), *correlation-shifting* (*coshift*), entre outros (Jellema, n.d.; Wu et al., 2006; Skov et al., 2006; Tomasi et al., 2004; Savorani et al., 2010; Sousa et al., 2013).

O algoritmo icoshift tem como objetivo alinhar os sinais relativos às mesmas espécies químicas entre os diferentes espectros de RMN. Para isso os sinais são alinhados em função de um determinado sinal espectral. Nesse algoritmo, de forma automática, primeiramente é feita a definição do intervalo de alinhamento, a maximização da correlação cruzada entre os sinais dentro do intervalo definido e, por último, a reconstrução dos sinais visando ao seu alinhamento (Savorani et al., 2010).

A figura 10 abaixo exemplifica o efeito do algoritmo icoshift no alinhamento dos sinais de RMN de hidrogênio.

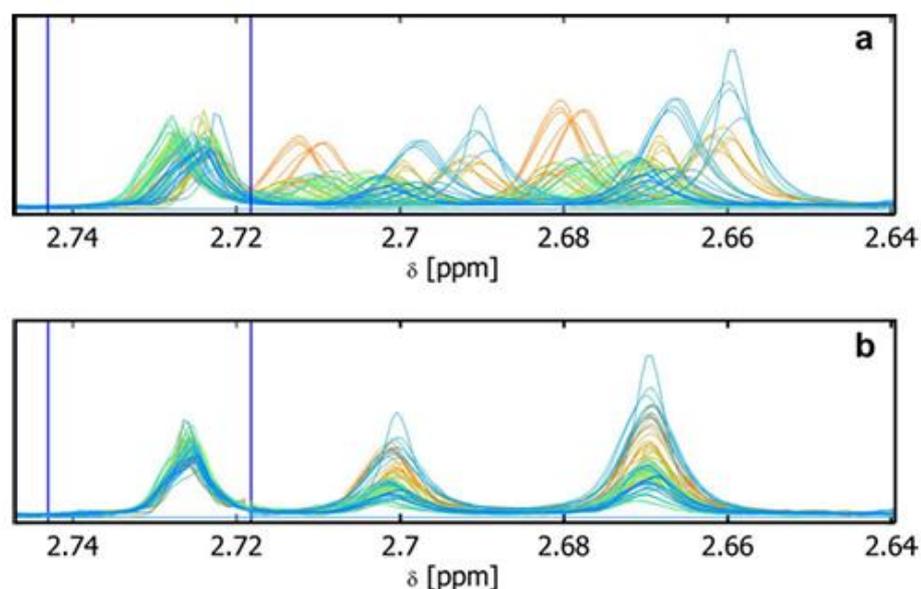
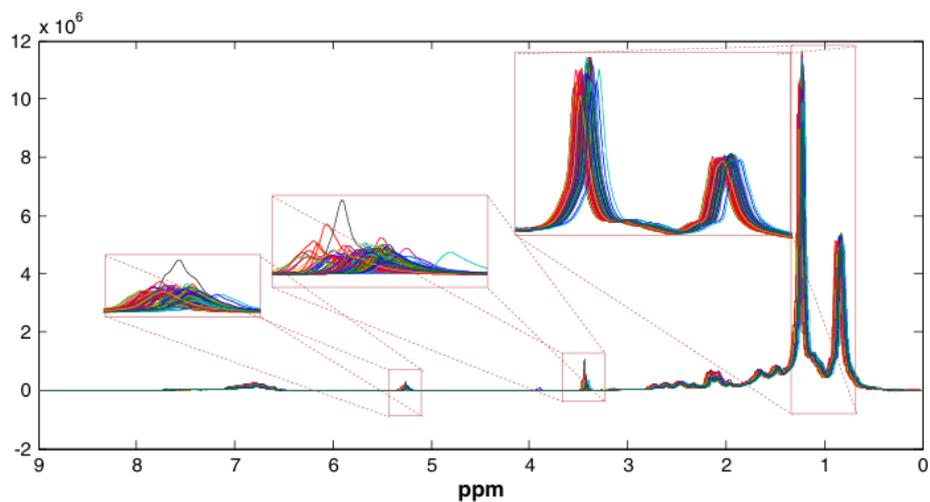


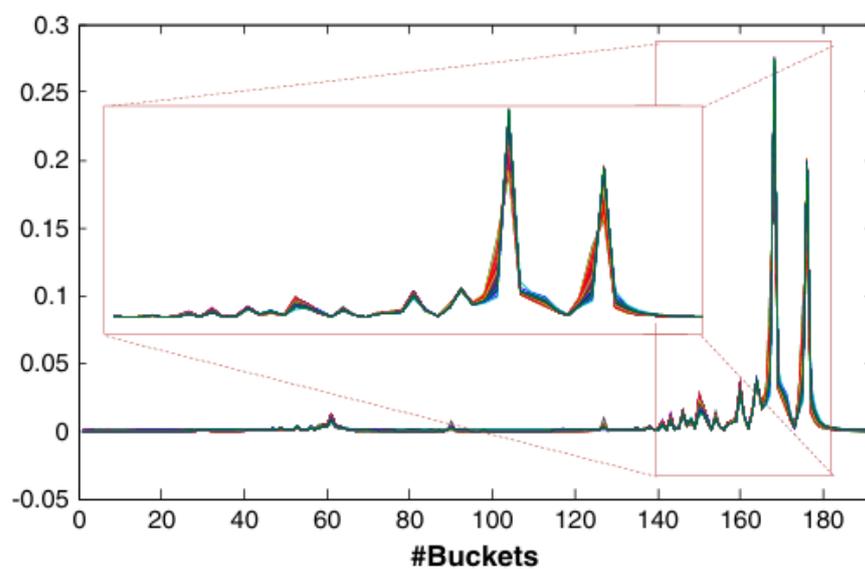
Figura 10. Exemplo de sinais de RMN de hidrogênio desalinhados (a) e alinhados (b) através do algoritmo icoshift. Fonte: Savorani et al., 2010.

O icoshift apresenta vantagens em seu uso na RMN quando comparados com outros métodos de alinhamento, já que este não modifica o formato do pico, ou seja, os desdobramentos de sinais de ressonância são mantidos, diferente de outros métodos de alinhamento, como por exemplo a COW (Savorani et al., 2013).

No caso do bucketing, os sinais dos espectros de RMN são divididos em janelas uniformemente espaçadas, e as intensidades dos sinais são somadas dentro de uma determinada janela (figura 11), de modo que as áreas, dentro de cada janela, são utilizadas para análise quimiométrica em vez da intensidade dos sinais de RMN isolados. Dessa forma um conjunto menor de variáveis é criado e a variabilidade dos deslocamentos químicos é reduzida (FERREIRA, 2015).



A



B

Figura 11. Exemplo de espectro de RMN antes da utilização do bucketing (A) e após utilização do bucketing (B). FONTE: Sousa et al.,2013.

Atualmente, o intervalo da janela utilizada pode ser determinado pela versão otimizada desse algoritmo, o que gera um melhor controle do alinhamento dos sinais referentes a um mesmo núcleo em ressonância no espectro de RMN (Sousa et al.,2013).

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Preparo da amostra

No total, 27 cervejas do estilo *sour* e *catharina sour* adquiridas em diferentes lojas nacionais foram analisadas. Inicialmente cada amostra foi transferida para um béquer e, com o auxílio do agitador magnético foram parcialmente desgaseificadas por cerca de 15 minutos. Em seguida, as amostras foram transferidas para banho ultrassônico por cerca de 20 minutos para retirar o máximo de gases restantes nas amostras.

Após a desgaseificação, parte das amostras foram transferidas para tubo tipo falcon, de 15 mL e foram centrifugadas por 40 minutos. Os sobrenadantes foram transferidos para outro tubo tipo falcon e os valores de pH foram medidos através do phmetro.

Foram adicionados a cada amostra bicarbonato de sódio (NaHCO_3) para formação de tampão com pH final em torno de 6,0.

Cerca de 15 mL das soluções obtidas com pH tamponado foram rotuladas e congeladas. O restante das amostras não tamponadas foram rotuladas e congeladas para a eventual necessidade de análises futuras.

500 μL de cada cerveja amostra, oriunda dos processos citados anteriormente foram misturadas com 100 μL de solução de *TSP-d₄* em D_2O (10 mg/100 mL) em tubos de RMN de 5,0 mm.

As amostras preparadas foram imediatamente analisadas para evitar possíveis degradações por agentes químicos e microbiológicos.

3.2 Análise por RMN

As análises das amostras foram feitas em um espectrômetro de RMN Bruker Avance Neo de 600 MHz no laboratório de ressonância magnética de alta resolução da UFMG (LAREMAR) (Figura 12).



Figura 12- Foto RMN Bruker Avance 600 MHz. Disponível em: <https://laremar.ufmg.br/fotos/>

Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos utilizando os parâmetros da tabela x abaixo

Tabela 5- Parâmetros de aquisição dos espectros

Número de scans adquiridos	64
Temperatura	298 k
Janela espectral	19,8361 ppm
Número de pontos do fid	64000
Número de pontos acumulados	128000
Intervalo entre as aquisições dos espectros	5 s
Pulso	90°
Sonda utilizada	PROBE TXI 5 mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}/^{15}\text{N}/\text{Z}$ -grad

3.3 Tratamento de dados e construção do Modelo PCA

Os modelos de análises exploratórias PCA foram realizados no software MATLAB® 2010 juntamente com o pacote PLS_Toolbox, versão 5.2.2.

Os 27 espectros obtidos no RMN de 600 MHz foram processados no software Topspin, e nesse software foi possível exportar cada espectro no formato de texto, gerando um total de 131072 pontos para cada espectro, correspondente a uma janela espectral de 14,72 ppm.

Esses espectros no formato de texto foram transferidos para o software MATLAB® 2010 criando, assim, uma matriz (27x131072), na qual as linhas correspondem às amostras analisadas e as colunas às intensidades dos sinais de RMN em cada valor de ppm.

Como os espectros apresentam sinais apenas na faixa entre 0 ppm a 8,45 ppm, a maior do espectro abaixo de 0 ppm e acima de 8,45 ppm foram excluídas da matriz, gerando uma nova matriz (27x 58001).

O algoritmo *icoshift* foi utilizado para alinhar os sinais levemente deslocados entre as amostras e em seguida foi utilizado o algoritmo bucket, para agrupar os sinais em pequenas janelas de intervalos de 0,005 ppm, reduzindo, dessa forma, a matriz para (27x1459). Tal matriz foi utilizada para construção do modelo PCA utilizando o pré processamento centralização na média.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise de perfil químico

A RMN é uma técnica analítica que permite identificar simultaneamente várias espécies químicas de forma rápida e não seletiva (da Silva et al., 2019), dessa forma, espectros de RMN de ^1H foram obtidos para análise exploratória dos compostos presentes nas cervejas *sour* a fim de determinar seu perfil químico.

Os espectros de RMN de ^1H obtidos para as amostras de cervejas apresentam alta complexidade devido à grande quantidade de sinais observados, pelo fato de a cerveja ser uma mistura complexa de compostos químicos (da Silva et al., 2019; Duarte et al., 2002; J. E. Rodrigues & Gil, 2011; J. A. Rodrigues et al., 2011; Nord et al., 2004)

A figura 13 mostra um exemplo do espectro obtido para uma das amostras de cerveja no intervalo de 0,00 ppm a 8,50 ppm após a supressão do sinal da água. Essa faixa do espectro foi escolhida para análise já que não foram observados sinais abaixo de 0 ppm ou acima de 8,5 ppm nos espectros de hidrogênio gerados.

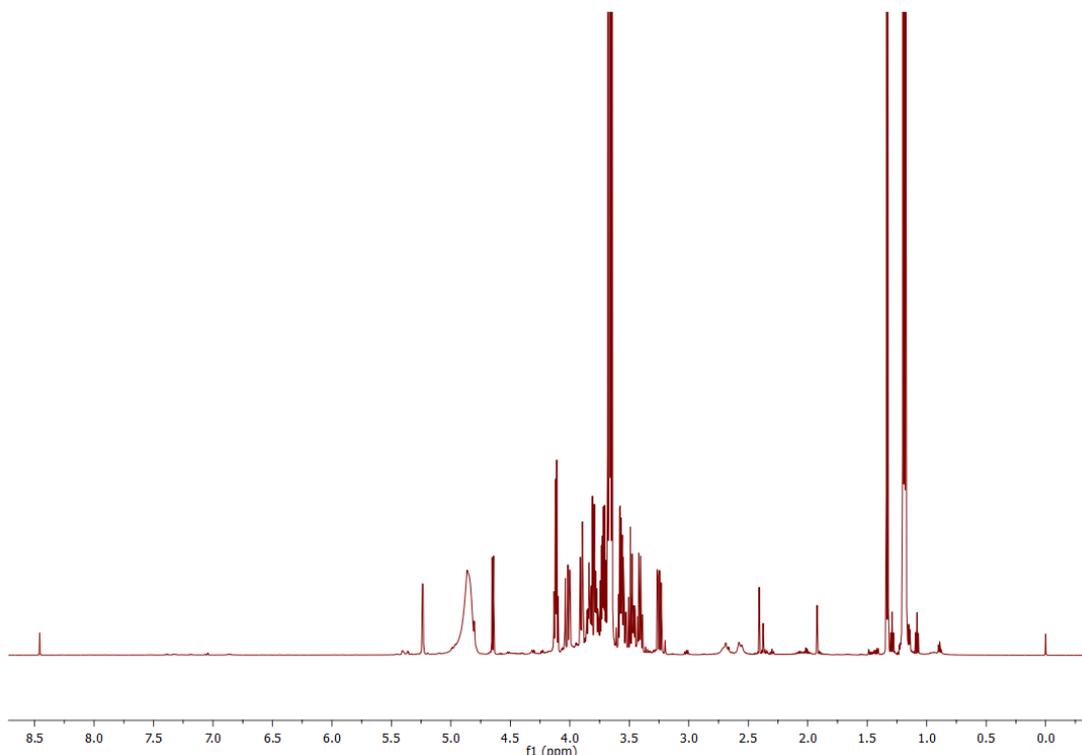


Figura 13 - Exemplo de espectro de hidrogênio na faixa de 0 ppm a 8,5 ppm de uma das amostras de cervejas.

Dois sinais intensos se destacam e foram atribuídos aos hidrogênios do etanol (Tabela 6). O primeiro sinal, em $\delta = 1,18$ ppm, referente aos hidrogênios metílicos ($-\text{CH}_3$), com multiplicidade de tripleto. O segundo sinal, atribuído aos hidrogênios metilênicos ($-\text{CH}_2$), em $\delta = 3,66$ ppm, com multiplicidade de quarteto. Neste mesmo sentido, destacam-se também outros dois sinais atribuídos aos hidrogênios do ácido láctico (Tabela 6). O primeiro sinal, em $\delta = 1,13$ ppm, com multiplicidade de duplete, foi atribuído aos hidrogênios metílicos. O segundo sinal, em $\delta = 4,10$ ppm, com multiplicidade de quarteto, foi atribuído ao hidrogênio metino desse composto.

Uma análise comparativa dos sinais de menor intensidade obtidos nos espectros de RMN de ^1H , com os sinais de compostos disponíveis em outros trabalhos sobre cervejas (de Jesus et al., 2024; Duarte et al., 2002; Khatib et al., 2006; da Silva et al., 2019; HMDB; Jeong et al., 2017; Palmioli et al., 2020; Nord et al., 2004; Rodrigues et al., 2011;) e com o banco de dados do programa Chenomx Suite 10.0 possibilitou a identificação de 30 compostos (Tabelas 6,7 e 8). Para facilitar a discussão, esses compostos serão apresentados e discutidos considerando três regiões do espectro de RMN de ^1H : $\delta = 0,6$ ppm a $\delta = 3,1$ ppm, $\delta = 3,2$ ppm a $\delta = 5,5$ ppm e $\delta = 5,5$ ppm a $\delta = 9,5$ ppm.

4.2 Análise de perfil químico de $\delta = 0,6$ ppm a $\delta = 3,1$ ppm.

A Figura 14 abaixo indica as atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ^1H na região de $\delta = 0,6$ ppm a $\delta = 3,1$ ppm de acordo com as suas constantes de acoplamento e as referências da literatura (Tabela 6).

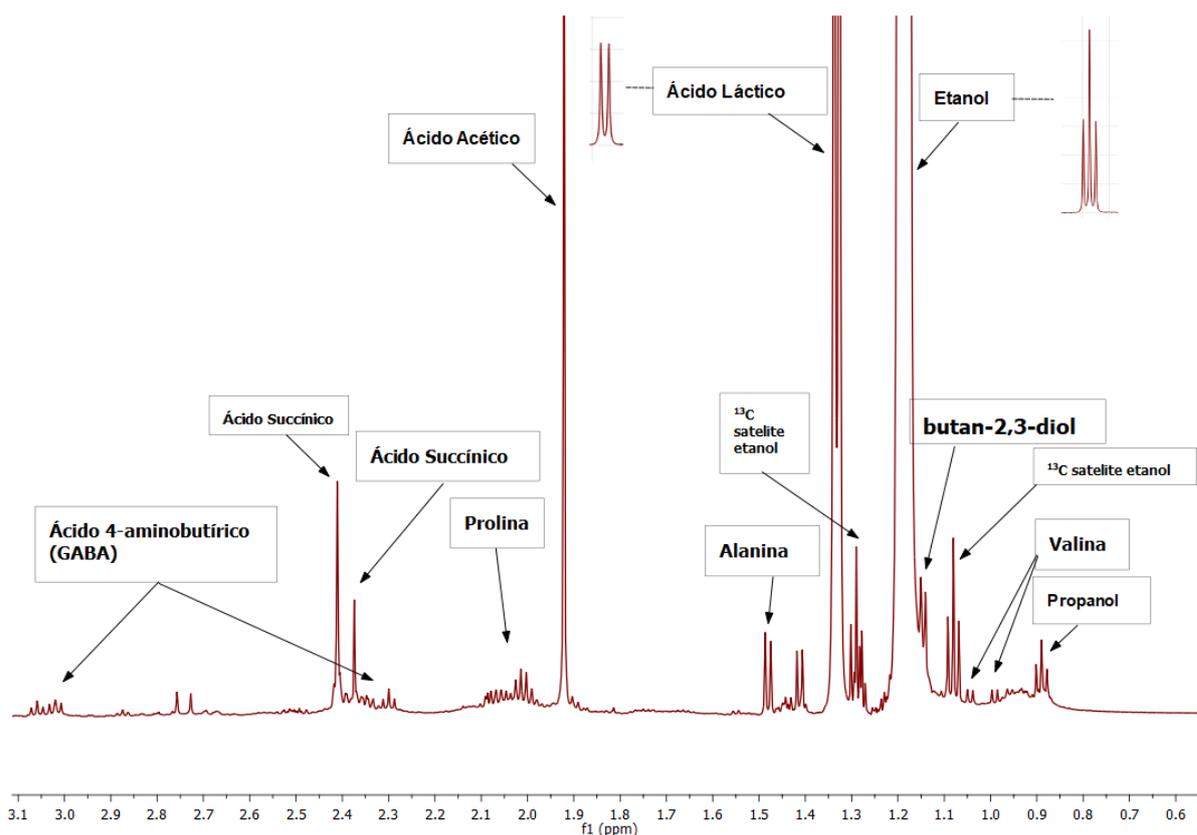


Figura 14 - Espectro de hidrogênio da amostra 7 na faixa de 0,6 ppm a 3,1 ppm (correlação dos sinais com as espécies identificadas).

Tabela 6- Atribuição dos compostos identificados na faixa de 0,6 ppm a 3,1 ppm com os respectivos deslocamentos químicos, multiplicidades, constantes de acoplamento e referências da literatura.

Composto	δ ¹H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Referências
Propan-1-ol	0,89	t	7,10	(de Jesus et al., 2024;Duarte et al., 2002)
Valina	0,97 e 1,03	d	7,00	(de Jesus et al., 2024; Nord et al., 2004;Chenomx, HMDB)
¹³ C satélite etanol	1,08 e 1,29	t	7,00	(da Silva et al., 2019)
Butan-2,3-diol	1,14	d	6,50	(de Jesus et al., 2024)
Etanol	1,18 e 3,66	t,q	7,00	(de Jesus et al., 2024; Duarte et al., 2002; Jeong et al., 2017)
Ácido Láctico	1,33 e 4,1	d,q	7,00	(de Jesus et al., 2024;Duarte et al., 2002;Khatib et al., 2006)
Alanina	1,50	d	7,00	(de Jesus et al., 2024; da Silva et al., 2019;Duarte et al., 2002;
Ácido Acético	1,92	s	-	(de Jesus et al., 2024;da Silva et al., 2019)
Prolina	1,97-2,11	m	-	(de Jesus et al., 2024;Duarte et al., 2002; Khatib et al., 2006)
Ácido 4-aminobutírico (GABA)	2,3 e 3,0	t,t	7,50	Chenomx (Duarte et al., 2002)
Ácido Pirúvico	2,37	s	-	(de Jesus et al., 2024;Duarte et al., 2002;Jeong et al., 2017)
Ácido succínico	2,40	s	-	Chenomx, HMDB
Ácido Cítrico	2,57	d	15	Chenomx

Diversos ácidos foram identificados através da análise dos sinais dos espectros de RMN de ^1H na região de $\delta = 0,6$ ppm a $\delta = 3,1$ ppm. Os simpleto em $\delta = 1,92$ ppm e $\delta = 2,37$ ppm foram atribuídos aos hidrogênios metílicos dos ácidos acético e pirúvico, respectivamente, enquanto o simpleto em $\delta = 2,40$ ppm foi atribuído aos hidrogênios metilênicos do ácido succínico. Também foi possível atribuir o tripleto em $\delta = 2,30$ ppm ($J = 7,50$ Hz), aos hidrogênios do carbono alfa em relação ao grupo carboxila do ácido 4-aminobutírico e o tripleto em $\delta = 3,00$ ppm ($J = 7,50$ Hz) aos hidrogênios do carbono ligado ao grupo amino desta mesma molécula. Já o duplete em $\delta = 2,57$ ppm ($J = 15,00$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios metilênicos do ácido cítrico.

Os duplete observado em $\delta = 0,97$ ppm ($J = 7,00$ Hz) e $\delta = 1,03$ ppm ($J = 7,00$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios metílicos do aminoácido valina, enquanto o duplete em $\delta = 1,50$ ppm ($J = 7,00$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios metílicos do aminoácido alanina. Também foi possível observar um multiplete entre $\delta = 1,97$ ppm e $\delta = 2,11$ ppm, atribuído aos hidrogênios ligados ao carbono beta em relação ao grupo amino do aminoácido prolina. Deve-se ainda destacar a identificação de dois álcoois na região entre $\delta = 0,50$ ppm e $\delta = 3,00$ ppm, com a observação de um tripleto em $\delta = 0,89$ ppm ($J = 7,10$ Hz) e um duplete em $\delta = 1,14$ ppm ($J = 6,50$ Hz), atribuídos aos hidrogênios metílicos do propano-1-ol e butan-2,3-diol, respectivamente.

É interessante observar a variedade de ácidos presentes nessas cervejas e, principalmente, o sinal de ácido láctico e acético com grande intensidade, o que condiz com a intensa acidez relatada para esse tipo de cerveja (Mitchell & Strong, n.d.).

A acidez total manifestada na cerveja se deve a ácidos inorgânicos, sendo o ácido fosfórico o principal presente nas cervejas, e ácidos orgânicos, voláteis e não voláteis. Destaca-se que parte dos ácidos identificados no presente trabalho são originários do mosto, enquanto outros são derivados do metabolismo das leveduras (Liu, 2015)

Os ácidos orgânicos presentes nas cervejas também são indicadores de sua qualidade e são muito importantes para seu perfil de sabor, cor, aroma e até mesmo a sua qualidade de fermentação. Dentre as técnicas analíticas de análise do perfil de ácidos na cerveja, frequentemente usam-se técnicas analíticas cromatográficas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Castellari et al, 2001; Montanari et al., 1999), a eletroforese capilar (EC) com detector ultravioleta (UV) (Klampfl, 1999) e a RMN (J. E. A. Rodrigues et al., 2010), esta última principalmente por se tratar de

uma técnica rápida e que quantifica simultaneamente diversos ácidos presentes nas cervejas. Na literatura os ácidos geralmente relatados em cervejas através da análise por RMN são o acético, cítrico, láctico, málico, pirúvico e succínico o que, com exceção do ácido málico, coincide com os ácidos identificados nos espectros na maior parte das amostras deste trabalho.

A tabela 7 abaixo exemplifica as concentrações desses ácidos encontrados nas cervejas tradicionais por diferentes técnicas analíticas. Vale lembrar que os valores de concentrações podem flutuar por ser tratar de diferentes marcas ou tipos de cervejas analisadas.

Tabela 7 - Concentração de ácidos em cervejas tradicionais reportados na literatura.

Ácidos	Concentrações CLAE (mg/L) (Jeong et al., 2017)	Concentrações CLAE (mg/L) (Montanari et al., 1999)	Concentrações EC (mg/L) (Klampfl, 1999)	Concentrações RMN (mg/L) (J.E.A. Rodrigues et al., 2010)
Acético	60	28	105	60
Cítrico	80	108	178	120
Láctico	40	99	556	60
Málico	-	57	68	100
Pirúvico	80	48	108	70
Succínico	50	49	49	60

As cervejas do tipo *sour* por sua vez apresentam maior teor de ácido láctico e acético. Kumara e Verachtert demonstraram que cervejas *sour* do tipo Lambic, por exemplo, apresentam teor de ácido láctico maior que 4000 mg/L e ácido acético maior que 800 mg/L, por exemplo (Kumara & Verachtert, 1991).

É importante destacar que a elucidação e a quantificação de compostos orgânicos presentes nas cervejas por RMN já foram amplamente realizadas para diversos tipos de cervejas, porém a literatura carece de análises para cervejas do estilo *sour* e seus subtipos, seriam interessantes trabalhos futuros que quantificassem os diferentes ácidos presentes nas cervejas *sour* para comparação com as cervejas tradicionais e para controle de qualidade destas. Nesse sentido, é esperado que, para cervejas do tipo *sour*, a diversidade de ácidos apresente maior concentração que em

outros tipos de cervejas, uma vez que aquelas possuem menor valor de pH, indicando, portanto, maior acidez (Krogerus & Gibson, 2013).

Durante a fermentação do mosto, cetonas são produzidas, dentre elas, um importante é a butandiona, conhecida como diacetil, um *off-flavour* que confere gosto amanteigado indesejado à cerveja. Esse composto é um produto secundário da biossíntese da valina, esta última identificada nos espectros de RMN das cervejas do presente trabalho. A presença de butan-2,3-diol nas cervejas analisadas pode ser explicada pela redução enzimática do diacetil pelas leveduras na fase de maturação das cervejas, o que é benéfico, uma vez que o limite tolerado para esse composto em cerveja é maior do que o diacetil, já que o seu aroma não possui impacto muito significativo no sabor da cerveja (Krogerus & Gibson, 2013).

A presença do ácido 4-aminobutírico (GABA) nas cervejas é relatada na literatura e pode ser explicada pela resposta ao estresse gerado aos *Lactobacillus* devido ao ambiente ácido relativo à produção das cervejas *sour*. À medida que a acidez é intensificada na produção da cerveja, o aminoácido glutamato extracelular internalizado tem a sua carboxila ligada ao carbono alfa removida (descarboxilação), gerando o ácido 4-aminobutírico (GABA). Nesse processo ocorre consumo de íons H⁺ e elevação do pH intracelular (Dysvik, Leanti, et al., 2020).

4.3 Análise de perfil químico de $\delta = 3,2$ ppm a $\delta = 5,5$ ppm

A Figura 15 abaixo indica as atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ^1H na região de $\delta = 3,2$ ppm a $\delta = 5,5$ ppm de acordo com as suas constantes de acoplamento e as referências da literatura (Tabela 8).

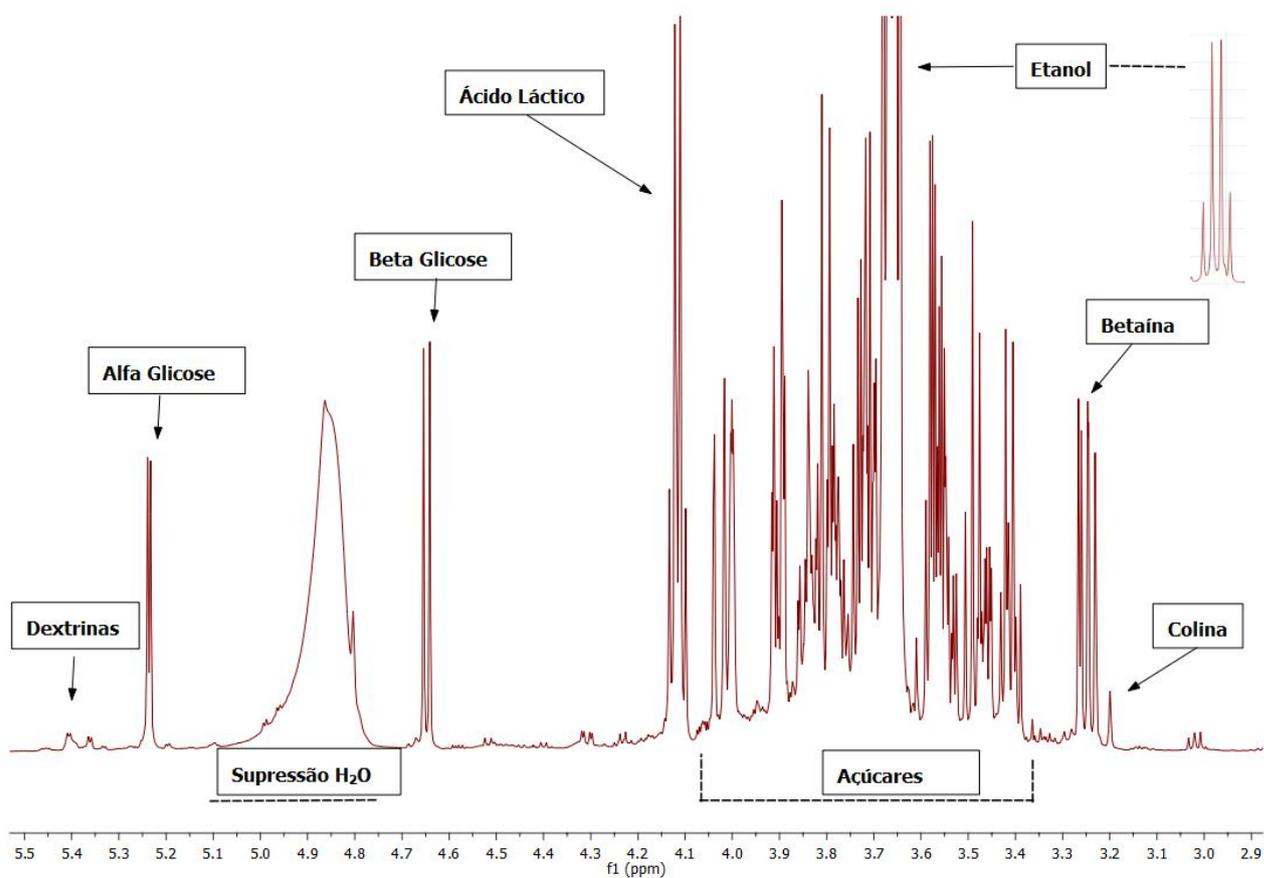


Figura 15 - Espectro de hidrogênio da amostra 9 na faixa de 2,9 ppm a 5,5 ppm (correlação dos sinais com as espécies identificadas)

Tabela 8 - Correlação dos compostos identificados na faixa de 2,9 ppm a 5,5 ppm com os respectivos deslocamentos químicos, multiplicidades, constantes de acoplamento e referências da literatura.

Composto	δ ¹H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Referências
Colina	3,20	s	-	(de Jesus et al., 2024; Khatib et al., 2006)
Betaína	3,26	s	-	(de Jesus et al., 2024)
Maltose	3,24	dd	-	(Duarte et al., 2002; Chenomx)
Beta Glicose	4,64	d	8,00	(de Jesus et al., 2024; Duarte et al., 2002)
Trehalose	5,19	d	4,00	(de Jesus et al., 2024)
Alfa Glicose	5,23	d	3,55	(de Jesus et al., 2024; Duarte et al., 2002)
Dextrinas	5,40	m	-	(de Jesus et al., 2024; Jeong et al., 2017)

A atribuição dos sinais às espécies químicas na região de $\delta = 3,2$ ppm a $\delta = 5,5$ ppm, região que predomina carboidratos, é complexa, uma vez que os sinais dos hidrogênios desses compostos se sobrepõem devido a seus deslocamentos químicos muito próximos. No entanto, alguns compostos podem ser identificados pelos sinais dos hidrogênios anoméricos dos açúcares (de Jesus et al., 2024). Parte desses carboidratos é utilizada durante o processo de fermentação, convertendo esses compostos principalmente em etanol e gás carbônico. De acordo com as referências relatadas na tabela 8 o duplete em $\delta = 4,64$ ppm ($J = 8,0$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios anoméricos da beta-glicose, enquanto o duplete em $\delta = 5,23$ ppm ($J = 3,55$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios anoméricos da alfa-glicose. O duplete em $\delta = 5,19$ ppm ($J = 4,00$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios anoméricos da threhalose. Também foi identificado um duplo duplete em $\delta = 3,24$ ppm atribuído à maltose e um multiplete centrado em $\delta = 5,40$, ppm atribuído aos hidrogênios de dextrinas. Ainda nessa região, foram observados dois simpleto em $\delta = 3,20$ ppm e $\delta = 3,26$ ppm, atribuídos aos hidrogênios dos grupos metílicos da colina e da betaína, respectivamente.

Os açúcares não consumidos observados nos espectros (açúcares residuais) são uma variável importante para investigar a intensidade e a qualidade da fermentação gerada pela levedura na produção das cervejas analisadas. Também vale destacar que o tipo de levedura utilizada, a temperatura durante a fermentação (fator que diferencia as cervejas *ales* e *lagers*) e o tempo de fermentação são fatores importantes para a intensidade da fermentação alcoólica promovida pela levedura.

A degradação de ácidos nucleicos presentes nas cervejas durante o processo de maltagem e de mosturação são responsáveis por gerar purinas, pirimidinas, nucleotídeos e nucleosídeos (Burriati, 2009). Consequentemente, esse fator pode explicar a presença dos nucleosídeos guanosina, uridina, citidina e adenosina (tabela 9) nas cervejas *sour* analisadas.

4.4 Análise de perfil químico de $\delta = 5,5$ ppm a $\delta = 9,5$ ppm

A Figura 16 abaixo indica as atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ^1H na região de $\delta = 5,5$ ppm a $\delta = 9,5$ ppm de acordo com as suas constantes de acoplamento e as referências da literatura (Tabela 9).

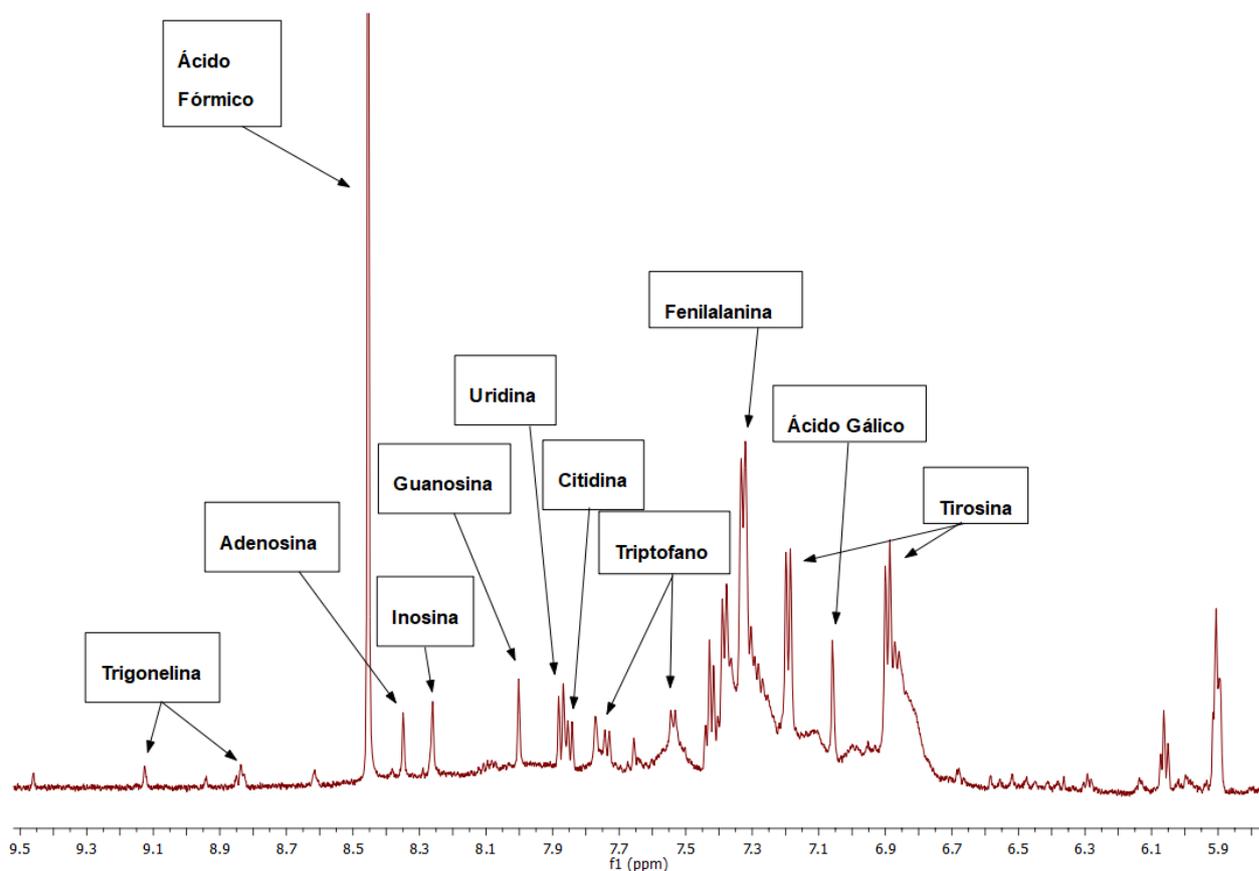


Figura 16 - Espectro de hidrogênio da amostra 26 na faixa de 5,5 ppm a 9,5 ppm (correlação dos sinais com as espécies identificadas).

Tabela 9 - Correlação dos compostos identificados na faixa de 5,5 ppm a 9,5 ppm com os respectivos deslocamentos químicos, multiplicidades, constantes de acoplamento e referências da literatura.

Composto	δ ¹H (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)	Referências
Tirosina	6,88 e 7,18	d,d	8,50	(de Jesus et al., 2024; Duarte et al., 2002;Khatib et al., 2006; Nord et al., 2004; Chenomx)
Ácido Gálico	7,05	s	-	(Duarte et al., 2002;Rodrigues et al., 2011; Chenomx, HMDB)
Fenilalanina	7,33	d	8,00	(de Jesus et al., 2024;Nord et al., 2004)
Triptofano	7,53 e 7,74	d,d	8,00	(de Jesus et al., 2024;Duarte et al., 2002;Nord et al., 2004)
Citidina	7,84	d	7,53	(Jeong et al., 2017; Chenomx)
Uridina	7,87	d	8,50	(Duarte et al., 2002; Chenomx)
Guanosina	8,00	s	-	Chenomx, HMDB
Inosina	8,26	s	-	(de Jesus et al., 2024;Duarte et al., 2002).
Adenosina	8,34	s	-	(Duarte et al., 2002;Khatib et al., 2006;Chenomx)
Ácido Fórmico	8,45	s	-	(de Jesus et al., 2024;Duarte et al., 2002)
Trigonelina	9,13 e 8,83	s,m	-	(Palmioli et al., 2020)

Os sinais observados na região entre $\delta = 5,5$ ppm e $\delta = 9,5$ ppm possuem menor intensidade em comparação com outras regiões dos espectros analisados. O duplete observado em $\delta = 6,88$ ppm ($J = 8,50$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios aromáticos ligados ao carbono alfa em relação a hidroxila fenólica do aminoácido tirosina, e o sinal em $\delta = 7,18$ ppm, com o mesmo acoplamento, foi atribuído aos hidrogênios aromáticos ligados ao carbono beta em relação a hidroxila fenólica deste mesmo aminoácido. O duplete em $\delta = 7,33$ ppm ($J = 8,00$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio na posição para em relação ao substituinte do anel aromático do aminoácido fenilalanina. O duplete em $\delta = 7,53$ ppm ($J = 8,00$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono beta do anel aromático de seis membros do aminoácido triptofano, e o duplete em $\delta = 7,74$ ppm ($J = 8,00$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio aromático vizinho a este último hidrogênio.

O duplete em $\delta = 7,84$ ppm ($J = 7,53$ ppm) foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono alfa em relação ao grupo amida presente no nucleosídeo citidina. O duplete em $\delta = 7,87$ ppm ($J = 8,50$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono alfa em relação ao grupo amida presente nucleosídeo uridina. O simpleto em $\delta = 8,00$ ppm foi atribuído ao único hidrogênio ligado ao carbono do anel do nucleosídeo guanosina, enquanto o simpleto em $\delta = 8,26$ ppm foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono alfa do anel de cinco membros do nucleosídeo inosina. O simpleto em $\delta = 8,34$ ppm, de forma análoga à guanosina e inosina, foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono alfa de um anel de cinco membros do nucleosídeo adenosina.

O simpleto em $\delta = 7,05$ ppm foi atribuído ao hidrogênio aromático do ácido gálico e o simpleto em $\delta = 8,45$ ppm foi atribuído ao hidrogênio ligado a carbonila do ácido fórmico sendo que este último apresenta sinal de intensidade consideravelmente maior que os outros sinais nessa região de sinais analisada. O sinal de simpleto em $\delta = 9,13$ ppm foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono do anel que fica entre o nitrogênio e o carbono que liga a carboxila do alcaloide trigonelina e o multiplete em $\delta = 8,33$ ppm foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono em posição para em relação a carboxila do anel e ao hidrogênio em posição para em relação ao nitrogênio do anel desta mesma molécula.

Os aminoácidos presentes nas cervejas analisadas (valina, alanina, prolina, tirosina, fenilalanina, triptofano) são originados principalmente pelo malte utilizado e são muito importantes no mosto, já que são utilizados pelas leveduras durante a fermentação (Fontana, 2009). Além disso, as proteínas e seus derivados, como os

aminoácidos, desempenham um papel fundamental na estabilidade da espuma, na turbidez das cervejas e no sabor. Embora os aminoácidos sejam metabolizados pelas leveduras durante o processo de fermentação (Fontana, 2009), existe uma ordem preferencial para consumo desses compostos como ilustrado na tabela 10 abaixo.

Tabela 10. Comparação da velocidade de metabolização de diferentes aminoácidos na produção de cervejas. Fonte: (Fontana, 2009)

Absorção rápida	Absorção Intermediária	Absorção Lenta	Pouca ou nenhuma absorção
Ácido glutâmico	Valina	Glicina	Prolina
Ácido aspártico	Metionina	Fenilalanina	
Asparagina	Leucina	Tirosina	
Glutamina	Isoleucina	triptofano	
Serina	histidina	alanina	
Treonina			
lisina			
arginina			

Nos espectros foram possíveis observar sinais relativos a aminoácidos que apresentam absorção intermediária (valina), lenta (fenilalanina, tirosina, triptofano e alanina) ou praticamente nenhuma (prolina). Talvez um dos fatores que explique a inexistência de sinais de aminoácidos de absorção rápida esteja relacionada ao seu consumo pelas leveduras durante a fermentação.

Apenas 30% dos compostos nitrogenados, incluindo aminoácidos, presentes no malte são preservados na cerveja produzida (Fontana, 2009), logo é esperada baixa concentração de aminoácidos no produto final e, conseqüentemente, baixas intensidades de sinais de RMN, como foi observado nos espectros do presente trabalho e também em outros trabalhos de RMN da literatura relacionados a cervejas relatados nas referências das tabelas 6,8 e 9.

É interessante observar que o metabolismo de aminoácidos pode gerar álcoois superiores, uma vez que os aminoácidos, no caso a treonina, têm seu grupo amino removido pela enzima transaminase, posteriormente são descarboxilados, com

formação de aldeído, e, depois, reduzidos, gerando o propano-1-ol observado nas cervejas do presente trabalho (Liu, 2015).

Os ácidos fórmico e gálico identificados nessa faixa do espectro possuem sinais com baixa intensidade quando comparados aos ácidos identificados na faixa de 0,6 ppm a 3,1 ppm, o que sugere a baixa concentração desses ácidos nas cervejas. A via de formação do ácido fórmico ainda não é bem esclarecida pela literatura (Li & Liu, 2015), enquanto a presença de ácido gálico e outros compostos fenólicos frequentemente encontrados nas cervejas é devido principalmente ao malte utilizado em sua produção (Nardini, 2023).

4.5 Modelos Quimiométricos

4.5.1 Tratamento dos dados de RMN

Após obtenção dos espectros de RMN de Hidrogênio das amostras de cerveja *sour*, os espectros foram exportados no formato *.txt* do software Topspin 4.1. Os espectros salvos no formato *.txt* foram transformados em matrizes dentro do software MATLAB® 2010.

Levando em conta uma boa prática no preparo das amostras (cuidado com o pH, temperatura e concentração de sais), são inerentes ao método ao menos pequenas variações nos sinais de ressonância referente às mesmas espécies químicas, o que atrapalha a construção do modelo PCA.

No presente trabalho o primeiro método para alinhamento dos sinais utilizado foi o *icoshift* (Jellema, n.d.; Savorani et al., 2010).

A Figura 17 demonstra as pequenas variações de deslocamentos químicos relativos ao sinal do ácido láctico entre as amostras de cervejas analisadas. É possível observar na figura como o *icoshift* ajuda na sobreposição dos sinais referentes às mesmas espécies químicas.

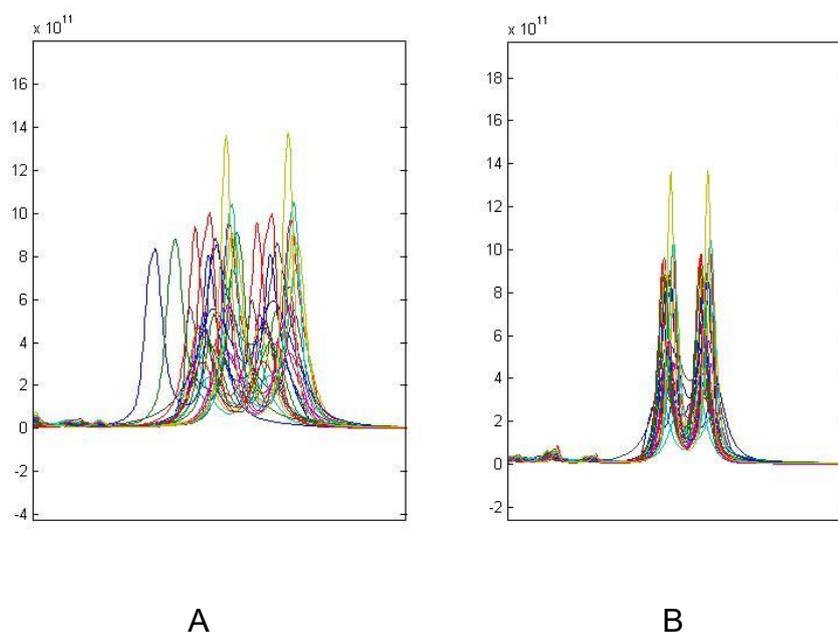


Figura 17 - Sinais sobrepostos relativos ao ácido láctico antes (A) e depois (B) do tratamento de dados com o icoshift.

Além do *icoshift*, outro método para alinhamento dos sinais utilizado foi o *bucketing*, em que os sinais de ressonância dos espectros são agrupados em janelas com um determinado valor de deslocamento em ppm escolhido (Sousa et al., 2013; Jellema, n.d.).

Dessa forma, os espectros de hidrogênio, que inicialmente possuíam aproximadamente 130000 pontos, referente aos deslocamentos químicos, com valores de intensidades específicas, foram reduzidos para buckets com intervalos de 0,005 ppm, resultando em 1459 buckets.

A Figura 18 demonstra como os sinais do ácido láctico das amostras são agrupados dentro de um determinado bucket, evitando, assim, de forma mais aprimorada, problemas de não sobreposição de sinais relativos aos mesmos componentes químicos entre diferentes amostras de cervejas. A utilização dos algoritmos *icoshift* e *bucketing* foram totalmente satisfatórios para a sobreposição dos sinais relativos aos mesmos compostos entre os diferentes espectros de RMN.

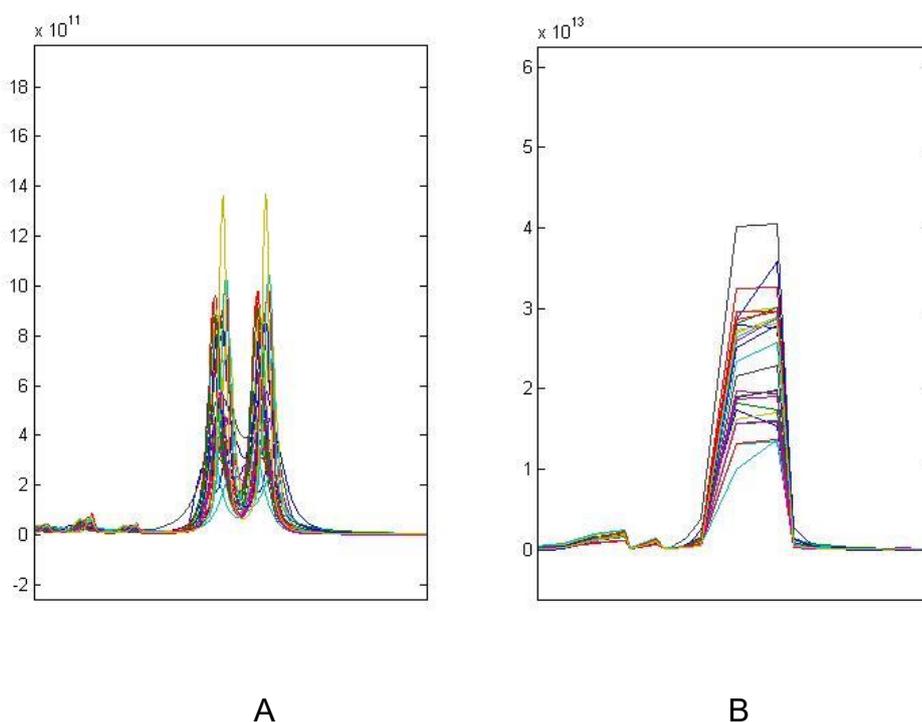


Figura 18 - Sinais sobrepostos do ácido láctico (A) antes e (B) depois do bucketing.

4.5.2 Análise PCA

Dois modelos PCAs foram construídos, sendo o primeiro modelo construído sem os sinais do etanol (1,2 ppm e 3,6 ppm) e os sinais dos açúcares (3,1 ppm a 5,5 ppm). Já o segundo modelo considera apenas os sinais do etanol e dos açúcares.

O primeiro modelo concentra a análise dos sinais dos hidrogênios alifáticos das cervejas *sours* característicos da faixa de deslocamentos escolhidos para o modelo. Os sinais referentes à região dos aromáticos (5,5 ppm a 9,5 ppm) também estão inclusos neste modelo, porém, devido à baixa intensidade dos sinais, estes compostos não são influentes na análise PCA, como será demonstrado a seguir.

O segundo modelo analisa o grau de fermentação alcoólica das cervejas *sours*, uma vez que corresponde ao sinal dos açúcares e do etanol presentes nas amostras (de Jesus et al., 2024). Ambos os modelos foram construídos após o pré-tratamento de dados citados anteriormente (*icoshift* e *bucket*), e como pré-processamento foi utilizado a centralização na média.

4.5.3 1º Modelo PCA

Através da análise do gráfico de variância capturada por componentes principais (Figura 19), o número de PC utilizado na construção do modelo foi de 2, o que explica uma variância total de 81,32% dos dados.

O aumento do número de PCs não resulta em um aumento significativo de informações capazes de discriminar novos agrupamentos.

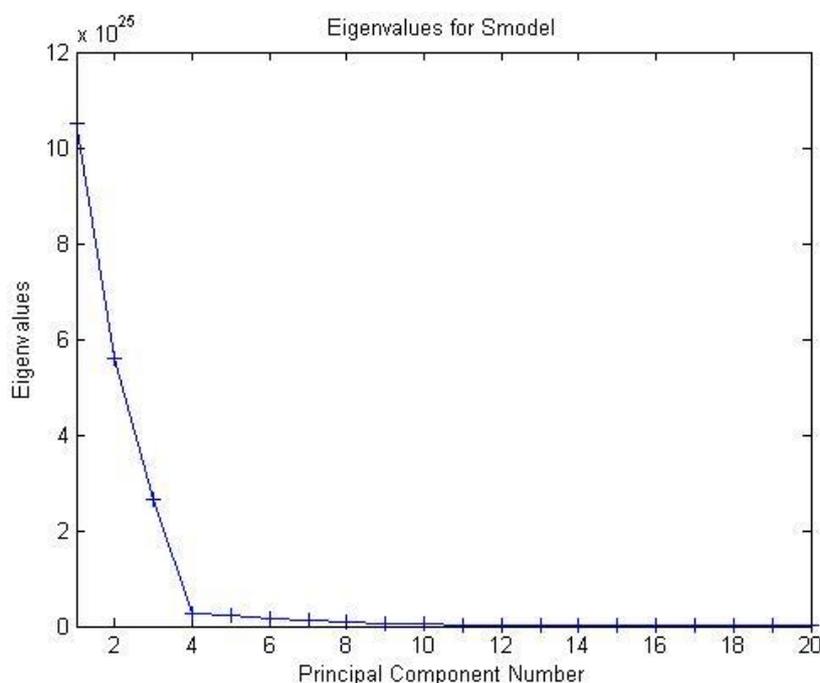


Figura 19 - Gráfico de Variância Capturada por Componente Principal relativo ao 1º modelo PCA.

Através da análise do gráfico de escores (Figura 20), é possível observar que PC1 é responsável por formar dois agrupamentos distintos. Um deles, caracterizados pelas amostras com valores positivos de escores na PC1, e o outro, pelas amostras com valores negativos de PC1. Já a PC2 está destacando a amostra 17 em relação as demais amostras. Com base no gráfico de pesos de PC1 (figura 21) é possível identificar os sinais responsáveis pela formação dos agrupamentos em PC1. Quatro compostos foram identificados como relevantes de acordo com esta PC, sendo eles os ácidos acético, láctico, succínico e o butan-2,3-diol.

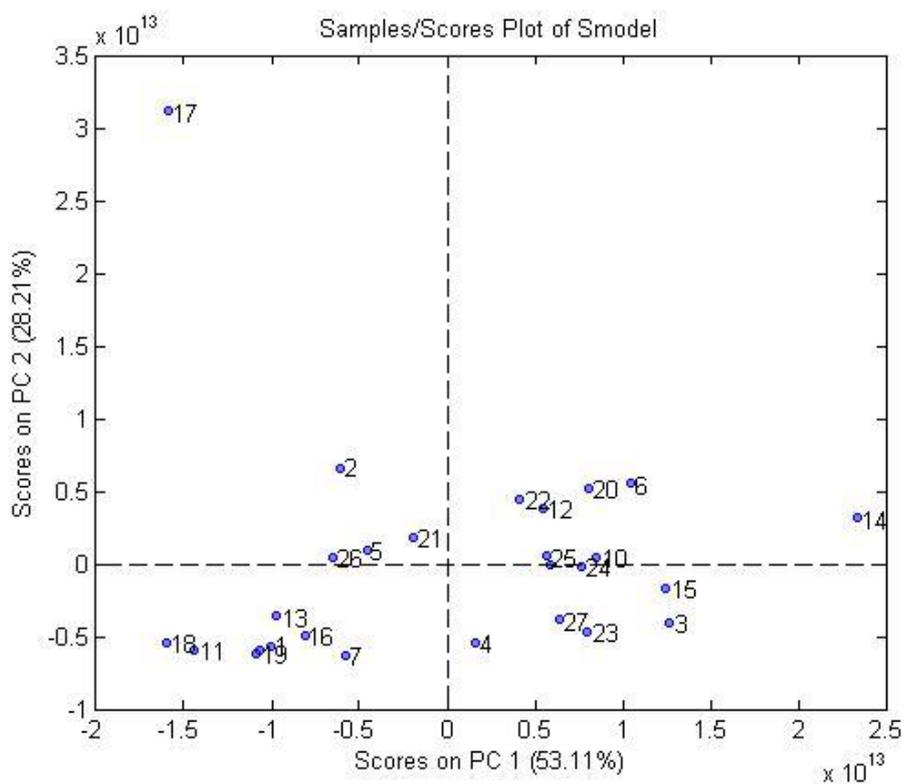


Figura 20 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas *sours* relativas ao 1º modelo PCA.

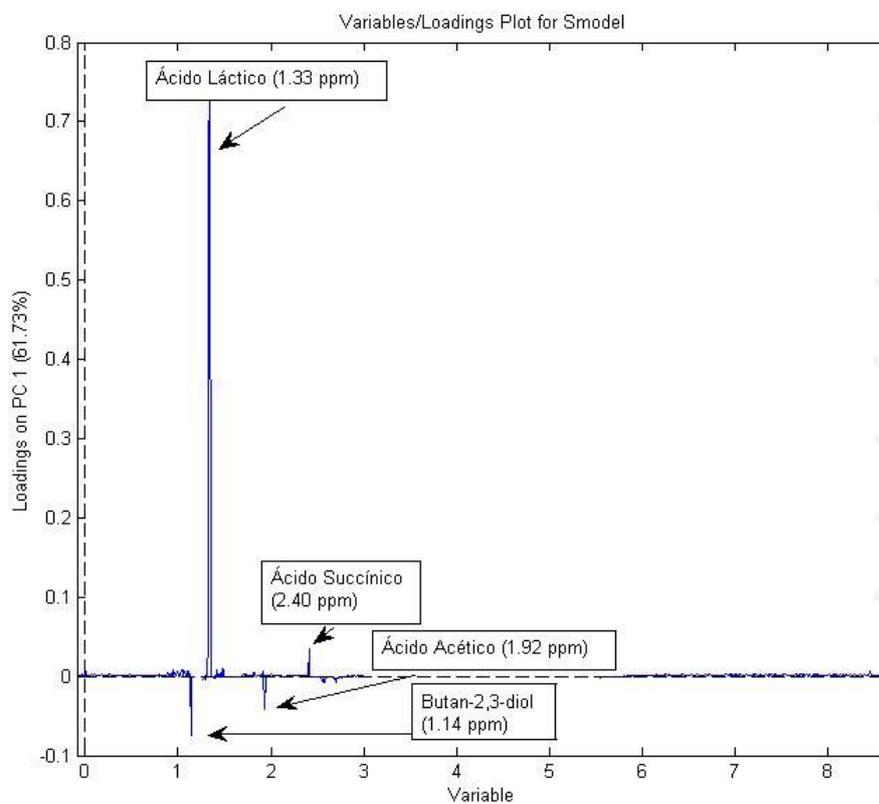


Figura 21 - Gráfico de Loadings em PC1 das amostras de cervejas *sours* relativas ao 1º modelo PCA.

Através da análise do gráfico de pesos em PC2 (Figura 22) é possível verificar que a amostra 17 se destaca do restante devido ao sinal referente ao ácido acético e ao butan-2,3-diol.

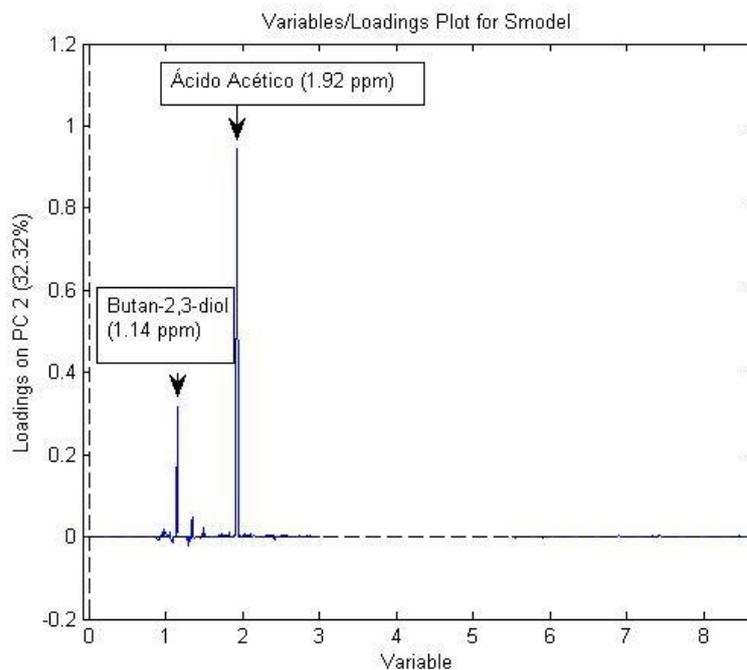


Figura 22- Gráfico de Loadings em PC1 das amostras de cervejas *sours* relativas ao 1º modelo PCA.

Na tentativa de correlacionar a discriminação dos dados em PC1 com as características das cervejas *sours*, a primeira hipótese levantada é se as classificações dos agrupamentos ocorrem em função da adição de frutas tropicais ou não tropicais nas cervejas analisadas.

Por meio do gráfico de scores (Figura 23) abaixo é possível observar que as cervejas com adição de frutas tropicais e cervejas com adição de frutas não tropicais estão distribuídas nas PCs de forma aleatória, evidenciando que não há correlação entre usar fruta tropical ou não na divisão dos sinais das cervejas em PC1.

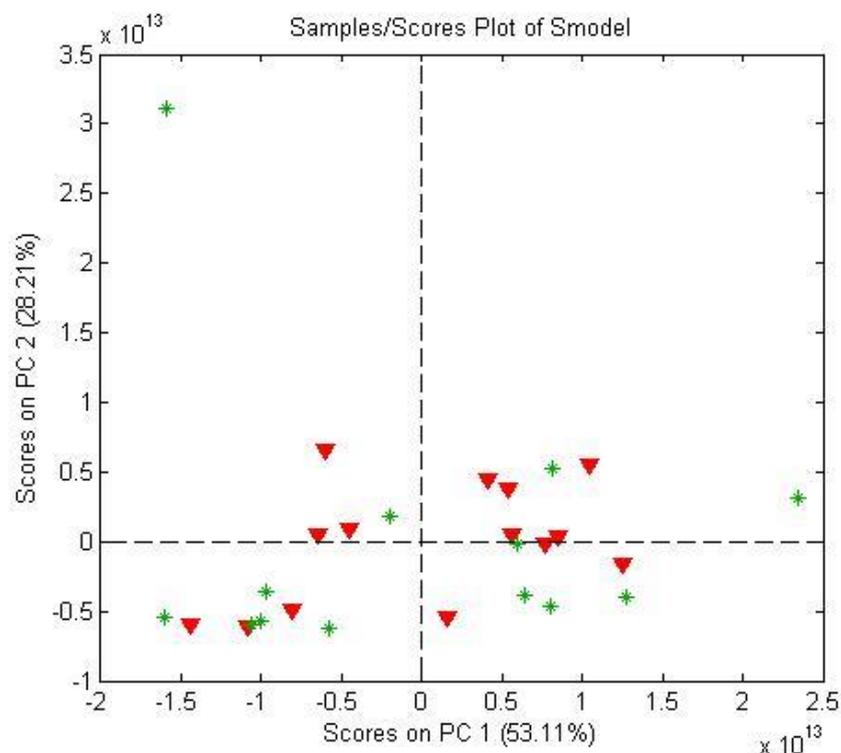


Figura 23 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas *sours* relativas ao 1º modelo PCA utilizando as classes frutas tropicais e frutas não tropicais. As amostras representadas pela cor verde são relativas àquelas com adição de frutas tropicais. As amostras representadas pela cor vermelha são relativas às amostras com adição de frutas não tropicais.

Outra hipótese levantada é se a discriminação em PC1 ocorre em função do tipo de fruta adicionada nas cervejas. Dessa forma novas classes baseadas especificamente nas frutas adicionadas foram utilizadas no modelo. As cervejas que não possuem repetições de frutas não foram classificadas uma vez que estas não são representativas para a sua classe.

Ao observar o gráfico de scores (Figura 24) abaixo, é possível observar novamente que as cervejas que possuem as mesmas frutas estão distribuídas aleatoriamente em PC1 e PC2.

As cervejas *sours* com adição de abacaxi, goiaba, mirtilo e jabuticaba, por exemplo, apresentam valores positivos e negativos em PC1, logo, não há correlação entre os agrupamentos de cervejas *sours* e as frutas utilizadas através dos espectros de hidrogênio de RMN.

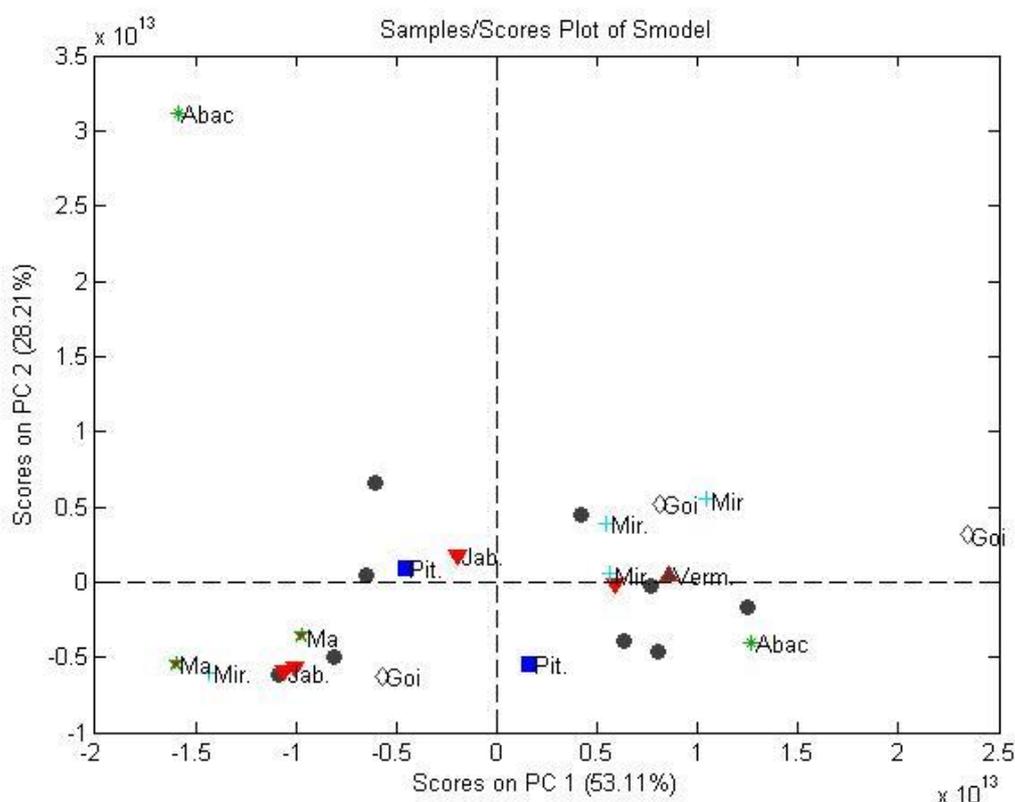


Figura 24 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas *sours* relativas ao 1º modelo PCA utilizando as classes de cervejas com adições de mesma fruta. Goi: goiaba; Ma: maracujá; Jab: Jaboticaba; Pit: pitaia; Mir: mirtilo; Abac: Abacaxi; Verm; frutas vermelhas.

Mais uma hipótese levantada é se os fabricantes das cervejas *sours* são responsáveis pela discriminação dos sinais das cervejas em PC1. Outras classes foram inseridas no modelo, dessa vez classificando as cervejas entre classes de mesmo fabricante.

Apenas os fabricantes que possuem mais de uma cerveja no modelo foram classificados, uma vez que os aqueles com apenas uma unidade de cerveja no modelo não são representativos para a sua classe.

O gráfico de scores (Figura 25) abaixo evidencia que apenas um dos fabricantes, sinalizado pelo losango branco do lado negativo de PC1 e PC2, possuem cervejas agrupadas no modelo, enquanto todos os outros fabricantes possuem cervejas distribuídas aleatoriamente pelo gráfico de scores.

Logo, não existe correlação entre os fabricantes de cervejas *sour* e as discriminações dos sinais em PC1.

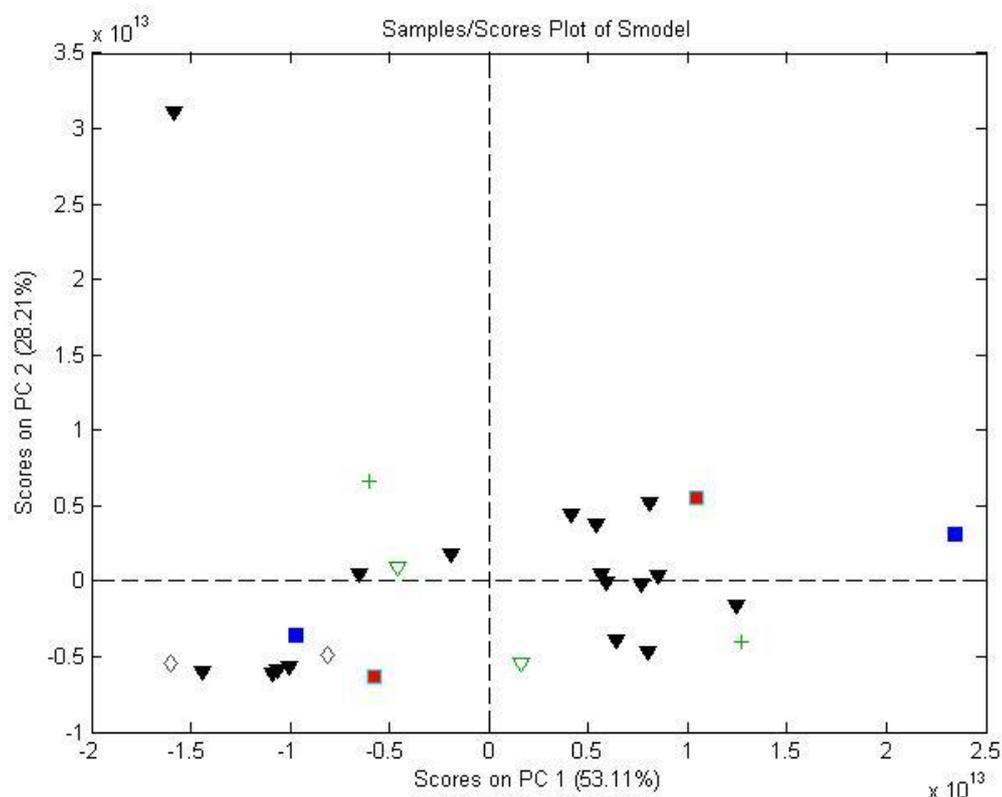


Figura 25 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas *sours* relativas ao 1º modelo PCA utilizando as classes de cervejas de mesmo fabricante.

Finalmente, outra hipótese levantada no presente trabalho é se existe correlação entre a discriminação dos dados de cervejas *sours* e os seus subtipos de cervejas. Dessa forma, duas novas classes foram utilizadas no modelo de acordo com as classificações apresentadas pelos fabricantes no rótulo do produto.

É imprescindível destacar que os fabricantes das cervejas brasileiras do gênero *sour* geralmente não especificam no rótulo qual o tipo de cerveja *sour* foi produzida, como mencionado no trabalho, existem diversos gêneros de cervejas *sour* com adição de frutas (Berliner Weisse com adição de frutas, Gose com adição de frutas, Flanders Red Ale com adição de frutas, Oud Bruin com adição de Frutas e Fruit Lambic) (Mitchell & Strong, n.d.).

Portanto, seguindo a classificação do rótulo dos fabricantes, as duas novas classes de cervejas foram divididas em: cervejas *sour catharina* e cervejas *sour*, sendo que a segunda classe engloba qualquer tipo de cerveja *sour* com adição de fruta que não seja do tipo *sour catharina*.

Como pode ser observado no gráfico de scores (Figura 26) no lado negativo de PC1 se encontram a maior parte das amostras de cerveja *catharina sour* (amostras

sinalizadas pela cor verde) enquanto as cervejas *sour* (sinalizadas pela cor vermelha) se encontram, com algumas exceções, do lado positivo de PC1.

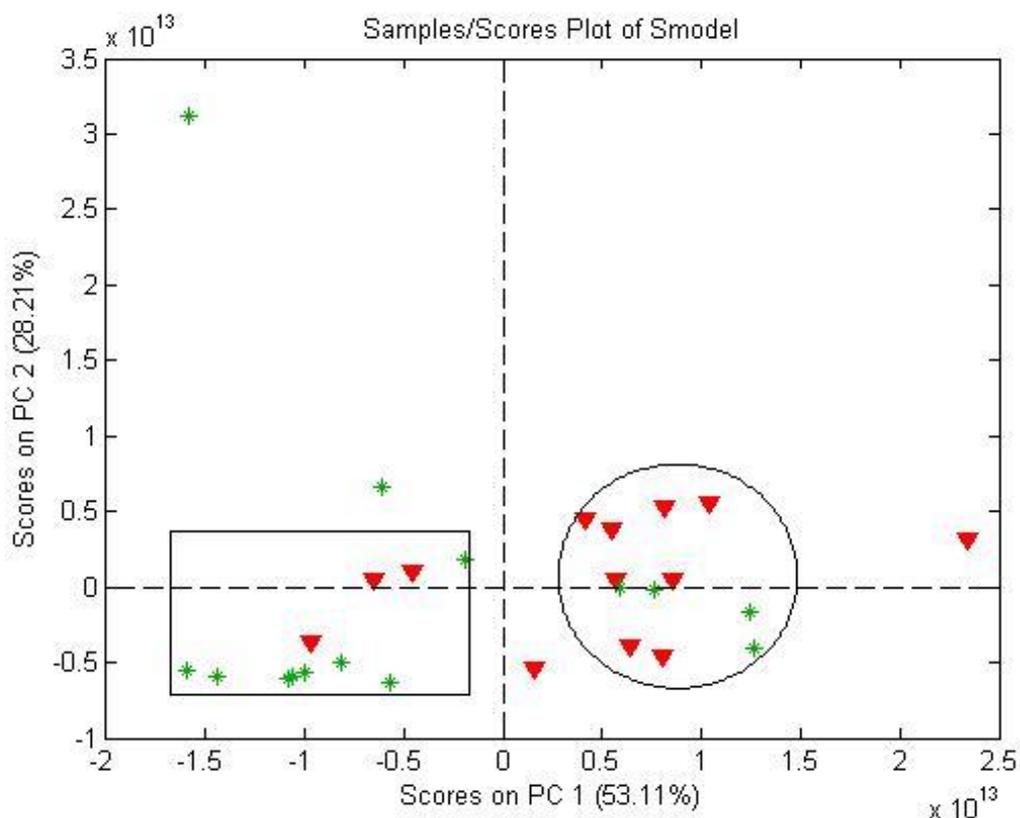


Figura 26 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas *sours* relativas ao 1º modelo PCA utilizando as classes *sour* e *sour catharina*. As amostras representadas pela cor verde são relativas às cervejas *sour catharina*, e as amostras representadas pela cor vermelha são relativas às cervejas *sour*.

Dessa forma o gráfico de scores (Figura 26) indica uma correlação, com exceções, das cervejas *catharina sour* e *sour* com os agrupamentos gerados em PC1.

Com base no gráfico de Loadings (Figura 22), e através da análise dos sinais dos espectros é possível também constatar que as amostras do lado positivo de PC1 (preferencialmente cervejas *sour*) apresentam maior teor de ácido láctico e succínico, enquanto que as cervejas do lado negativo de PC1 (geralmente *sour catharina*) apresentam maior teor de butan-2,3-diol, ácido acético. Sendo que o principal sinal que discrimina as amostras é referente ao ácido láctico.

4.5.4 2º Modelo PCA

Mediante a análise do gráfico de variância capturada por componentes principais (Figura 27) foi escolhido um número de PCs igual a 2, o que corresponde a uma variância total de 94,17% dos dados.

O aumento do número de PCs não gera praticamente nenhum ganho de variância explicada.

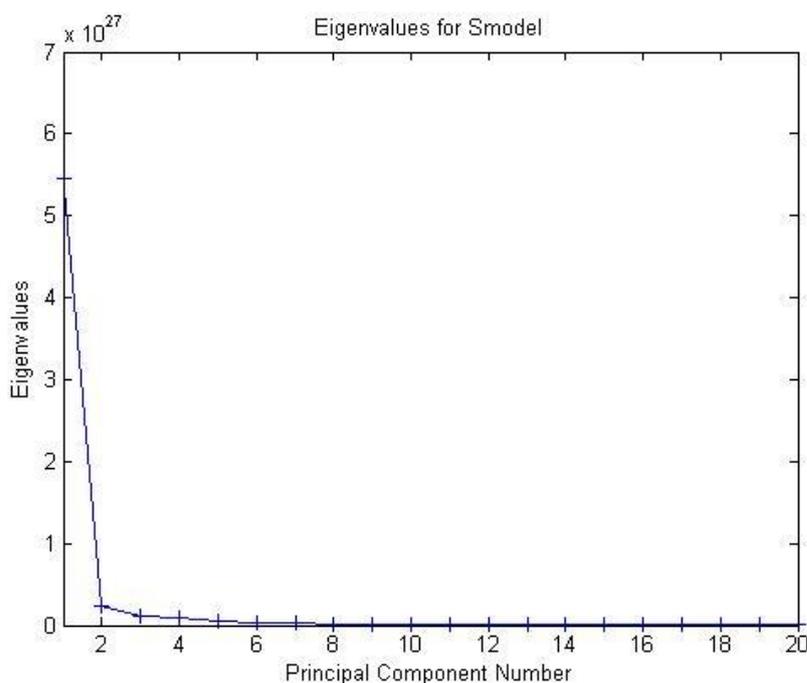


Figura 27 - Gráfico de Variância Capturada por Componente Principal relativo ao 2º modelo PCA.

Através do gráfico de escores (Figura 28), foi possível observar que PC1 é responsável por maior parte da discriminação dos dados (90.32%). Também se observa que nessa PC existe um grupo bem formado no valor positivo de PC1, se destacando, portanto, do restante das amostras. Por meio da Análise de PC2 vê-se que as amostras 17, 22 e 7 estão no valor positivo dessa PC, destacando-se do restante da amostra, porém essa PC discrimina apenas 3.85% dos dados.

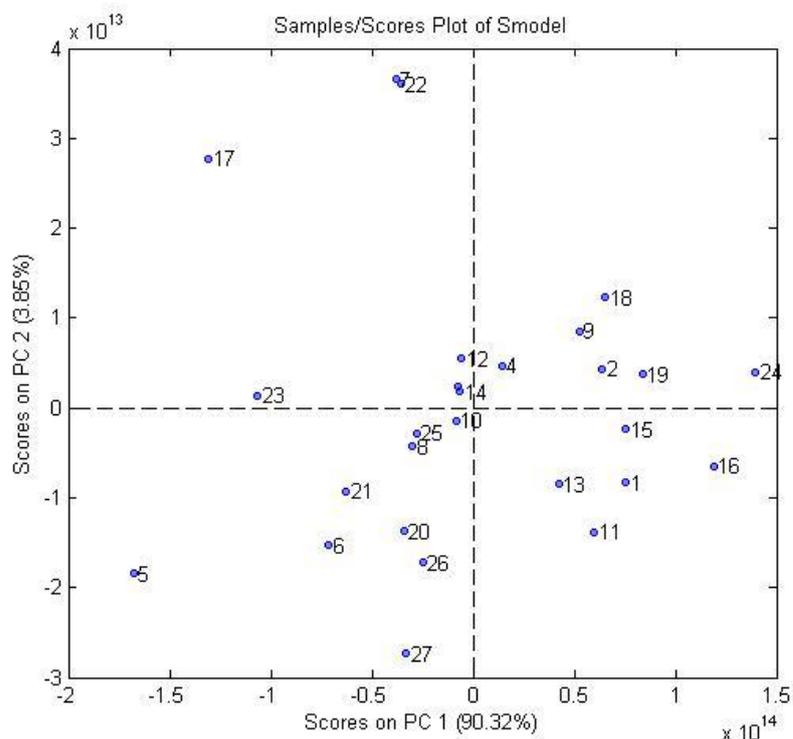


Figura 28-Gráfico de Scores das amostras de cervejas *sour's* relativas ao 2º modelo PCA.

Através da análise do gráfico de pesos em PC1 (Figura 29) e pela análise dos sinais dos espectros de RMN é possível constatar que as cervejas ao lado positivo desta PC possuem maior teor de etanol e menor teor de açúcares.

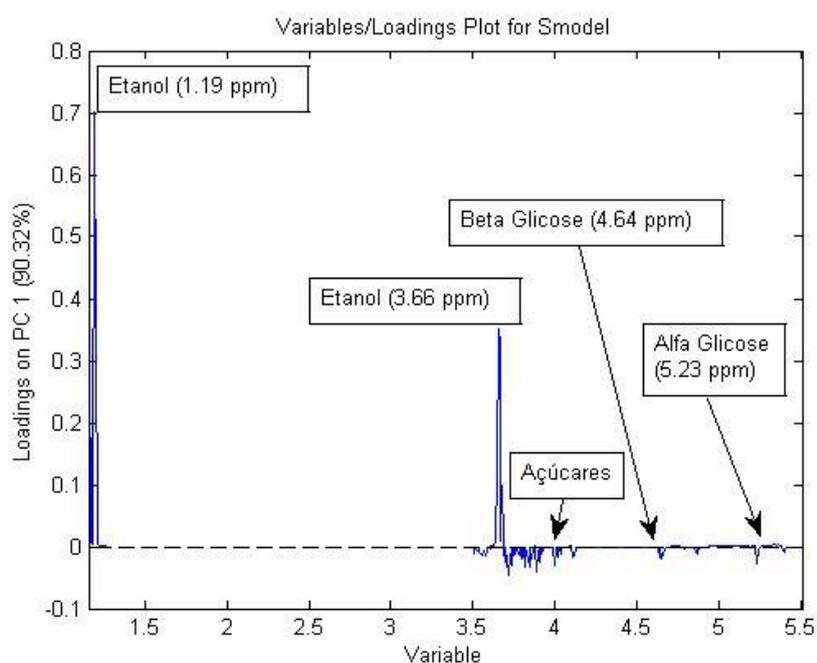


Figura 29 - Gráfico de Loadings em PC1 das amostras de cervejas *sours* relativas ao segundo modelo PCA.

Da mesma forma que o 1º modelo PCA do presente trabalho, é interessante analisar qual fator é responsável pela discriminação desses dados nas amostras de cervejas em PC1.

Foram testadas as mesmas classificações de cervejas do 1º modelo para tentar elaborar uma proposta do motivo do agrupamento de dados em PC1.

Portanto as primeiras classes testadas no modelo foram a de cervejas com adições de frutas tropicais e cervejas com adições de frutas não tropicais. Abaixo, é possível observar no gráfico de scores (Figura 30) que essas classes não são responsáveis pela discriminação dos grupos em PC1, uma vez que as amostras dessas classes estão distribuídas de forma aleatória no gráfico de scores.

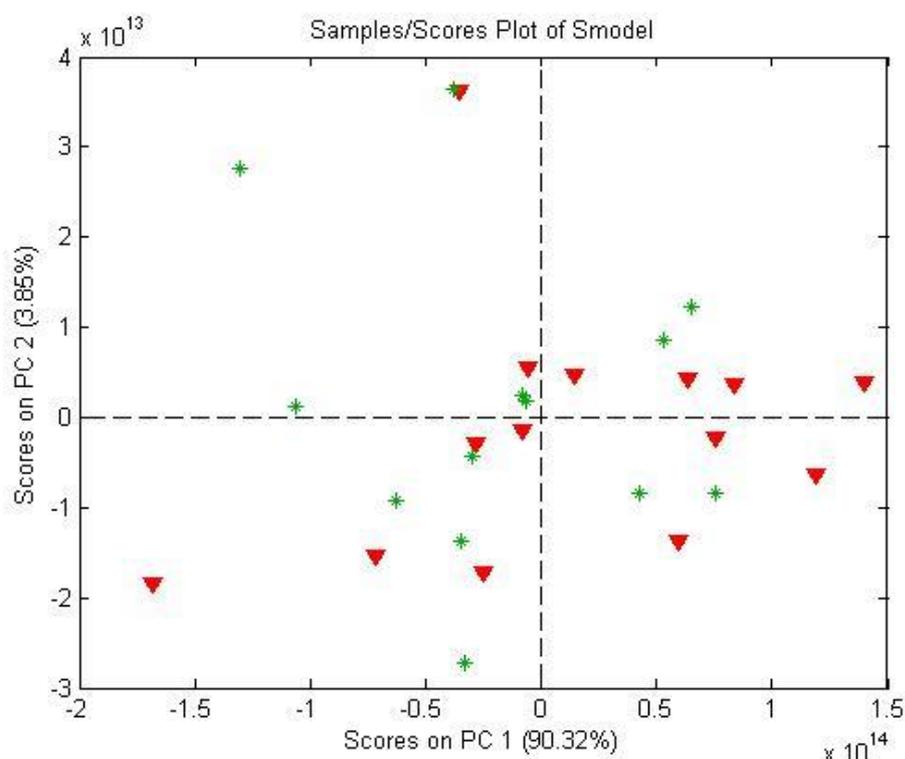


Figura 30 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas *sours* relativas ao 2º modelo PCA utilizando as classes frutas tropicais e frutas não tropicais. As amostras representadas pela cor verde são relativas às amostras com adições de frutas tropicais. As amostras representadas pela cor vermelha são relativas às com adições de frutas não tropicais.

A segunda hipótese testada é se o agrupamento em torno de PC1 é em função do tipo de fruta analisada. Observando o gráfico de scores (Figura 31), constata-se que essa classe não é responsável por diferenciar os sinais das cervejas nas faixas de deslocamentos químicos referentes aos açúcares e ao etanol das amostras, já que, com algumas exceções, novamente as cervejas que possuem adição de mesma fruta estão distribuídas aleatoriamente no gráfico de scores.

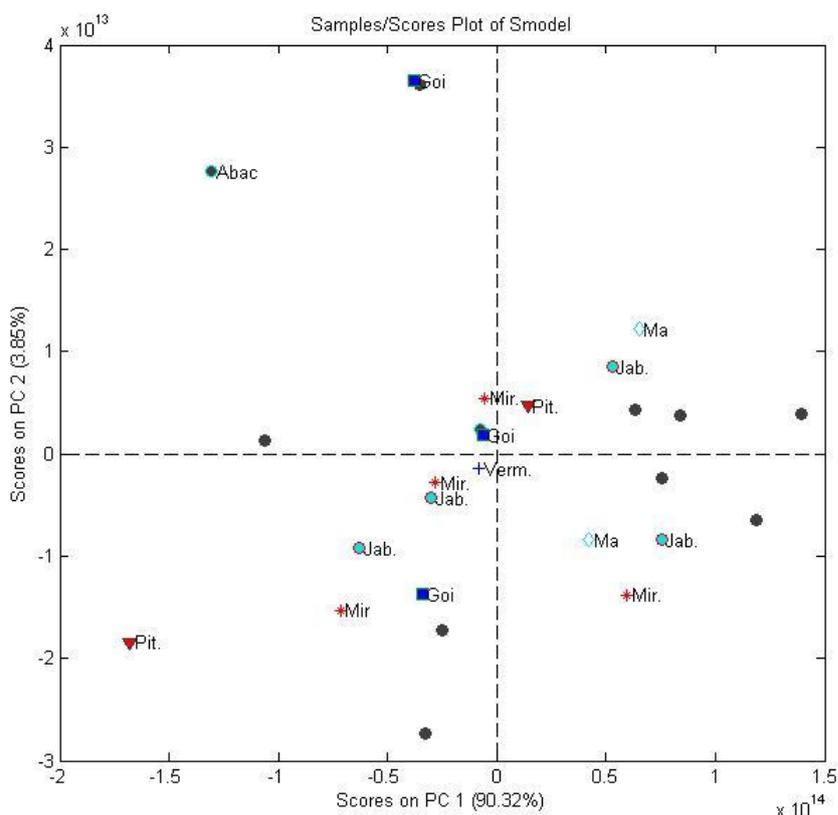


Figura 31 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas *sours* relativas ao 2º modelo PCA utilizando as classes de cervejas com adições de mesma fruta. Goi: goiaba; Ma: maracujá; Jab: Jaboticaba; Pit: pitaia; Mir: mirtilo; Abac: Abacaxi; Verm; frutas vermelhas.

A terceira hipótese é se o agrupamento formado em PC1 é devido às classes de fabricantes das cervejas *sours*. Também é possível constatar pelo gráfico de scores (Figura 32), devido à distribuição aleatória das cervejas de mesmo fabricante, que não existe correlação entre os fabricantes de cervejas *sour* e os agrupamentos em PC1.

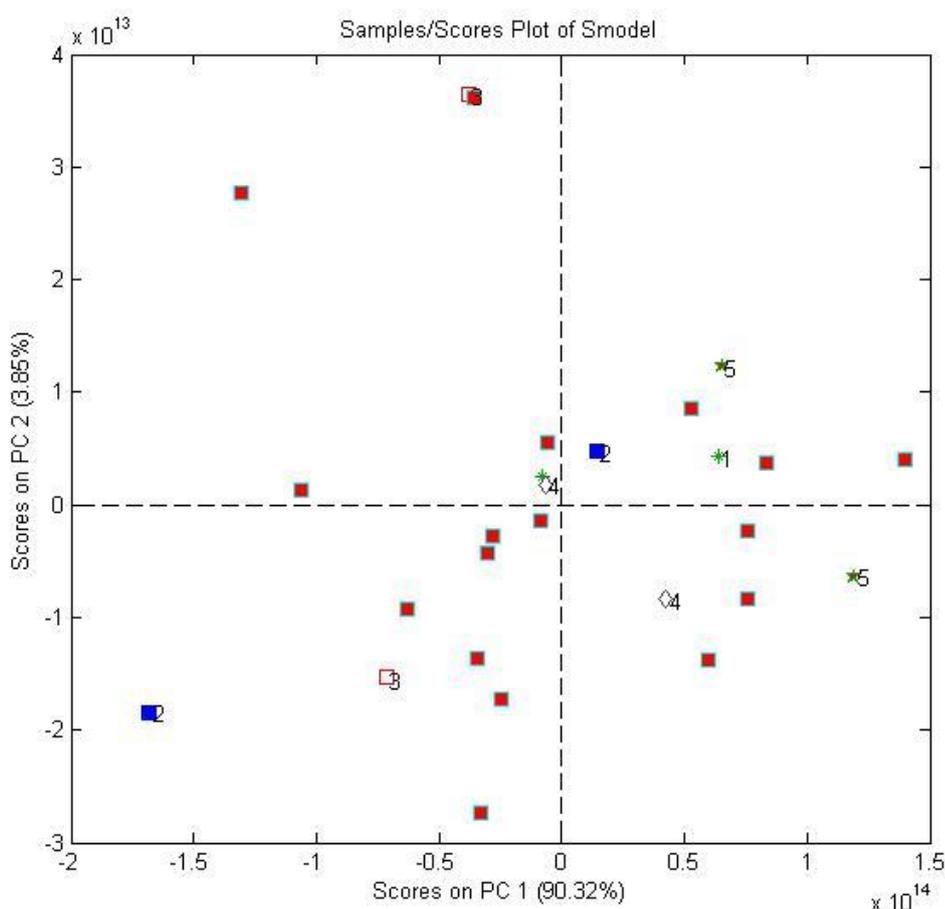


Figura 32 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas *sours* relativas ao 2º modelo PCA utilizando as classes de cervejas de mesmo fabricante.

Como no primeiro modelo, é importante ressaltar que, no segundo modelo PCA, as cervejas que possuem apenas uma amostra de um determinado fabricante não foram classificadas na PCA, já que essas não apresentam representatividade para o seu grupo, logo, somente fabricantes que têm mais de uma amostra no modelo entraram nestas classificações.

Por último, assim como foi feito no primeiro modelo, foi testada a hipótese de que a discriminação dos dados relativos às amostras de cervejas é dada pelo subtipo de cerveja *sour*.

Utilizando a classificação do rótulo do fabricante - *sour catharina* ou *sour* – tem-se que, pelo gráfico de scores (Figura 33), com algumas exceções, a maior parte das cervejas *sour catharina* estão do lado positivo de PC1.

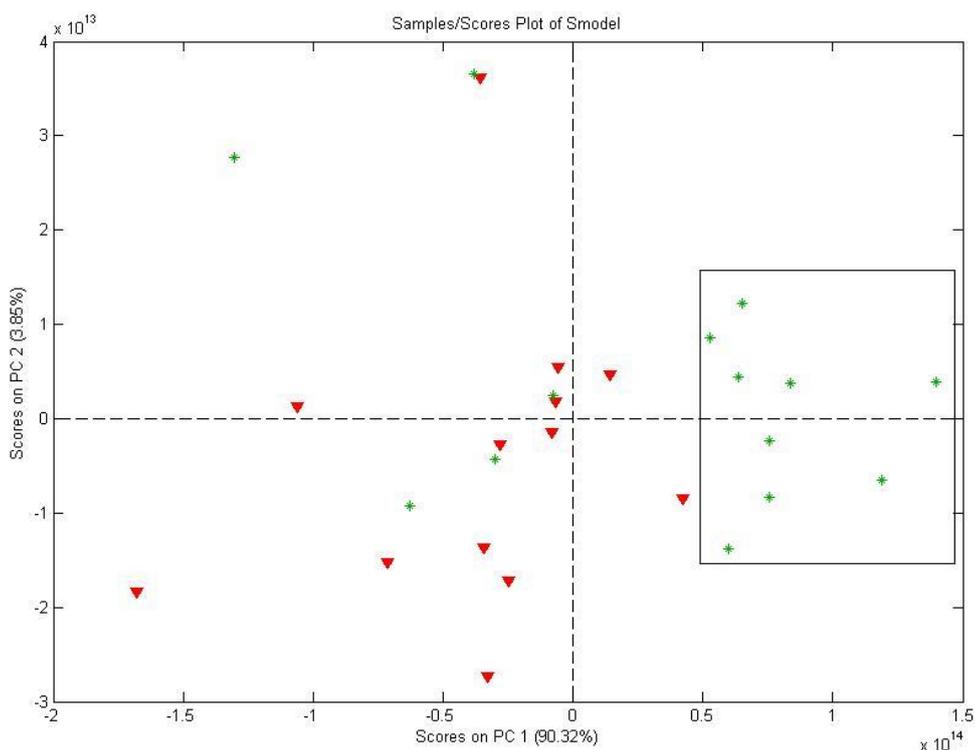


Figura 33 - Gráfico de Scores das amostras de cervejas *sours* relativas ao segundo modelo PCA utilizando as classes *sour* e *sour catharina*. As amostras representadas pela cor verde são relativas às cervejas *sour catharina*, e as amostras representadas pela cor vermelha são relativas às cervejas *sour*.

Ao mesmo tempo, é possível verificar no gráfico de Loadings (Figura 34) e pela análise dos espectros os sinais responsáveis pela discriminação dos dados em PC1, constatando que as cervejas *sour catharina* possuem maior teor de etanol, enquanto que as cervejas *sour* possuem maior teor de açúcares de forma geral.

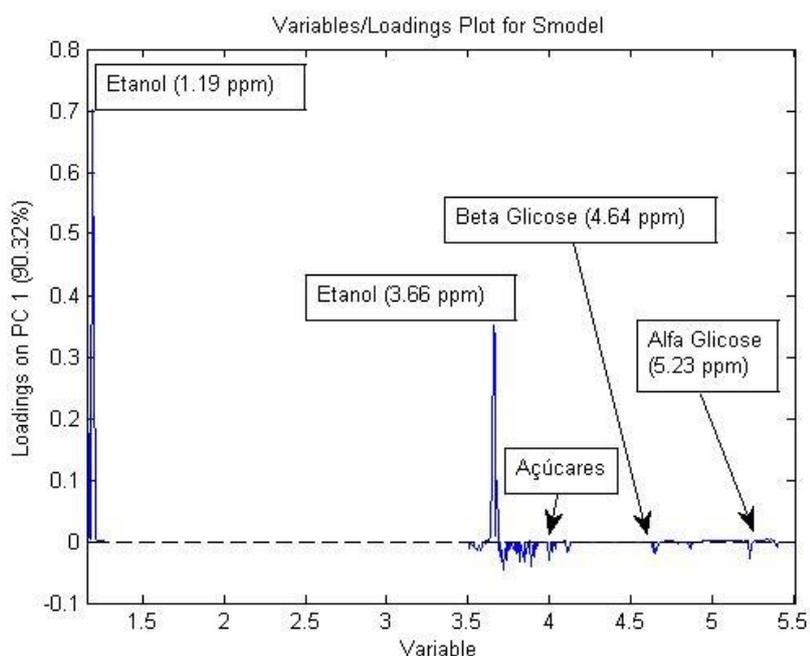


Figura 34 - Gráfico de Loadings em PC1 das amostras de cervejas *sours* relativas ao segundo modelo PCA.

A partir desta evidência, pode-se constatar que a classe de cervejas *catharina sour* apresenta maior teor de fermentação que a classe de cervejas *sour*, uma vez que se pode interpretar que a menor intensidade dos sinais dos açúcares é devido ao seu consumo na fermentação alcoólica para a produção de etanol.

Tanto no primeiro quanto no segundo modelo PCA, as classes presentes no rótulo do fabricante que dividem as cervejas *sour* em dois grupos: *sour catharina* e *sour*, foram responsáveis pelos agrupamentos dos dados em PC1, logo, pode-se concluir que o tipo de cerveja é mais importante na diferenciação destas do que o tipo de adição de fruta (tropical ou não), da própria similaridade de fruta, ou até mesmo da similaridade dos fabricantes.

Ao mesmo tempo é importante ressaltar, novamente, que essa conclusão é restrita à análise dos compostos detectados na RMN, que apresenta a limitação, por exemplo, da perda e conseqüentemente não análise das espécies voláteis presentes nas amostras.

Uma hipótese que justifica a diferença entre as cervejas *catharina sour* e *sour* foi elaborada no trabalho.

Como visto no tópico de “conceitos gerais e revisão da literatura” do presente trabalho nem toda cerveja *sour* permite adição de fruta ao mesmo tempo que nem toda cerveja que permite adição de fruta é do estilo *sour*.

As cervejas estudadas no presente trabalho se enquadram no estilo *sour* necessariamente com adições de frutas. Ao mesmo tempo, no rótulo das cervejas analisadas, o fabricante declara apenas as classes: cerveja *sour* ou *catharina sour*.

Dessa forma, pode-se concluir que as cervejas declaradas apenas como *sour* pelo fabricante, quando não especificada nos rótulos, podem se tratar do tipo Berliner Weisse, Gose, Flanders Red Ale, Oud Bruin, Fruit Lambic ou Wild Specialty Beer (tabela 11)

Tabela 11 - Cervejas *sour* com adição de fruta

Rótulo do Fabricante	Tipos de Cervejas Presentes
<i>Sour</i>	<i>Berliner Weisse</i> com adição de frutas
	<i>Gose</i> com adição de frutas
	<i>Flanders Red Ale</i> com adição de frutas
	<i>Oud Bruin</i> com adição de frutas
	<i>Fruit Lambic</i>
	<i>Wild Specialty Beer</i>
<i>Catharina Sour</i>	<i>Catharina Sour</i>

As cervejas *Fruit Lambic* assim como as cervejas *Lambic* e *Gueuze* são produzidas de forma clássica pela fermentação espontânea com leveduras e bactérias naturais durante anos (Bongaerts et al., 2021) e, por isso, são excepcionalmente caras (Mitchell & Strong, n.d.) em relação às outras cervejas *sour* com adição de frutas e, dessa forma, são pouco prováveis de estarem no gênero *sour* declarado pelo fabricante. Diante dessas informações foram investigados quais fatores nos métodos de produção dessas cervejas diferenciam as classes *sour* e *sour catharina* declarada pelo fabricante.

Como mencionado no presente trabalho um fator importante que diferencia a produção dessas cervejas é a levedura utilizada. A cerveja do tipo *catharina sour* deve utilizar necessariamente a levedura SAC, enquanto que as outros tipos de cervejas *sour* com adição de frutas utilizam a Levedura BRET pura, BRET junto com SAC e alguns casos apenas SAC.

A levedura BRET se destaca em relação à levedura SAC na sua capacidade de fermentar diversos tipos de açúcares (monossacarídeos, dissacarídeos, trissacarídeos, dextrinas e, inclusive, o amido) (Kumara et al., 1993; Postigo et al., 2023). Porém, Postigo e colaboradores (2023) demonstraram que existe uma diferença considerável na cinética das fermentações destas leveduras. A levedura BRET possui uma fermentação mais lenta que a levedura SAC, embora tenha a capacidade de fermentar diversos tipos de açúcares.

Além disso Kumara e colaboradores (1993) demonstraram que a ação da levedura BRET é lenta em pH abaixo de 4,5 e acima de 8,0, ademais, Blomqvist e

colaboradores (2010) demonstraram o maior crescimento da levedura SAC em relação à BRET em pH = 3.6, valor próximo das amostras analisadas.

Vale lembrar que utilizando o método mais moderno de produção de cervejas *sour*, o *kettle souring*, e, portanto, o mais provável para as amostras estudadas, após a fermentação láctea é esperado que o pH da cerveja *sour* fique em torno de 3,0, momento em que ainda será inoculada a levedura para fermentação alcoólica (SAC e LAB).

Esse pH pode diminuir, assim, a velocidade de fermentação das cervejas rotuladas pelo fabricante como *sour* (*Berliner Weisse* com adição de frutas, *Gose* com adição de frutas, *Flanders Red Ale* com adição de frutas, *Oud Bruin* com adição de Frutas e *Fruit Lambic*), diferenciando o teor de etanol e de açúcares em relação à classe *Catharina Sour*.

A levedura BRET possui alto poder de atenuação, ou seja, fermentação de açúcares na cerveja, porém esse efeito é intensivo quando está associada ao LAB, devido a efeitos sinérgicos (Kumara & Verachtert, 1991). Através da técnica do *Kettle Sour*, as bactérias LAB são removidas após fermentação láctea pela fervura do mosto, evitando o efeito sinérgico entre BRET e LAB, provavelmente explicando a queda de atenuação das cervejas com adição de BRET.

Dessa forma, as leveduras utilizadas nas produções de cerveja *sours* parecem justificar os agrupamentos formados no segundo modelo PCA, considerando que as cervejas *catharina sour* foram produzidas com a levedura SAC, que possuem, então, uma velocidade de fermentação maior, enquanto que as cervejas *sour* de forma geral são produzidas, com exceções, com levedura BRET, e, dessa forma, possuem uma velocidade de fermentação menor, principalmente devido às baixas condições de pH.

O ácido láctico produzido nas cervejas *sour* é proveniente da homofermentação dos LAB adicionados na sua produção, nesse processo de fermentação, parte dos açúcares hexose são convertidos em ácido láctico, preferencialmente (Dysvik et al., 2020).

A produção moderna de cervejas *sour* utiliza a técnica *kettle souring*, na qual o mosto é inoculado com *Lactobacillus* para fermentação láctea. Tal técnica é feita de maneira semelhante entre as cervejas *sour* (Dysvik et al., 2020), dessa forma o menor teor de ácido láctico nas cervejas *sour catharina* verificado no primeiro modelo PCA do presente trabalho deve ser justificada por outro fator.

Uma vez que os processos de produção de cervejas *sour* podem utilizar diferentes tipos de matérias primas e métodos, estudos futuros são necessários para apontar uma razão que justifique a diferença de produção de ácido láctico entre as classes rotuladas pelo fabricante, uma vez que existem muitas variáveis que podem interferir no teor desse ácido nas amostras, como tempo de fermentação láctea, tipo de malte utilizado, e até mesmo a quantidade ácido láctico adicionado no mosto antes da adição de *Lactobacillus*.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram a presença de 30 compostos orgânicos em 27 cervejas do tipo *sour* com adições de frutas, analisadas por RMN de hidrogênio. Assim foram identificadas as espécies orgânicas: propano-1-ol, valina, butan-2,3-diol, etanol, ácido láctico, alanina, ácido acético, prolina, ácido 4-aminobutírico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido cítrico, colina, betaína, maltose, glicose, threhalose, dextrinas, tirosina, ácido gálico, fenilalanina, triptofano, citidina, uridina, guanosina, inosina, adenosina, ácido fórmico e trigonelina.

Dois modelos PCA foram construídos: o primeiro excluiu sinais de etanol e açúcares, enquanto o segundo focou apenas nessas regiões. Diversas classes foram testadas para explicar os agrupamentos dos dados, como adição de frutas tropicais e não tropicais, tipo de fruta adicionada, fabricante e rótulo (*sour* e *sour catharina*). A discriminação mais eficaz foi encontrada com base no rótulo do fabricante (*sour* e *catharina sour*).

O primeiro modelo PCA revelou que as cervejas *sour* possuem maior teor de ácido láctico e succínico, enquanto as *sour catharina* possuem maior teor de butan-2,3-diol e ácido acético. Diversos fatores podem impactar essas diferenças, como o tipo de levedura utilizada na fermentação. As *sour catharina* utilizam levedura SAC, enquanto as *sour* tradicionais utilizam levedura BRET, que possui uma cinética de fermentação mais lenta e capacidade de fermentar uma variedade maior de açúcares.

O segundo modelo PCA mostrou que cervejas *sour* apresentam maior intensidade de sinais de açúcares e menor de etanol, ao contrário das *sour catharina*. A diferença de levedura e suas respectivas cinéticas de fermentação explicam essas variações. Estudos futuros devem focar na quantificação dos compostos presentes nas cervejas *sour* com adição de frutas para melhorar a caracterização e o controle de qualidade dessas cervejas.

REFERÊNCIAS

- BECKER, & EDWIN D. (n.d.). **High Resolution NMR Theory and Chemical Applications**. Third Edition.
- BLOMQVIST, J., EBERHARD, T., SCHNÜRER, J., & PASSOTH, V. (2010). **Fermentation characteristics of Dekkera bruxellensis strains**. Applied Microbiology and Biotechnology, 87(4), 1487–1497. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2619-y>
- BONGAERTS, D., DE ROOS, J., & DE VUYSTA, L. (2021). **Technological and Environmental Features Determine the Uniqueness of the Lambic Beer Microbiota and Production Process**. Applied and Environmental Microbiology, 87(18), 1–15. <https://doi.org/10.1128/AEM.00612-21>
- BRO, R., & SMILDE, A. K. (2014). **Principal component analysis**. In Analytical Methods (Vol. 6, Issue 9, pp. 2812–2831). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c3ay41907j>
- CAVALLINI, N., SAVORANI, F., Bro, R., & Cocchi, M. (2021). **A Metabolomic Approach to Beer Characterization**. Molecules, 26(5). <https://doi.org/10.3390/molecules26051472>
- CLARIDGE, T. D.W. (2016) **High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry**. Elsevier: Amsterdam.
- DA SILVA, L. A., FLUMIGNAN, D. L., PEZZA, H. R., & PEZZA, L. (2019). **¹H NMR spectroscopy combined with multivariate data analysis for differentiation of Brazilian lager beer according to brewery**. European Food Research and Technology, 245(11), 2365–2372. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03354-5>
- DE JESUS, L., FLORES, I., PINTO, V., RIBEIRO, G., MORAIS, K., & LIÃO, L. (2024). **NMR and Chemometrics in the Determination of Chemical Profiles for the Distinction of Brazilian Ale and Lager Beers**. Journal of the Brazilian Chemical Society. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20230192>
- DE ROOS, J., & DE VUYST, L. (2019). **Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production**. In Journal of the Science of Food and Agriculture (Vol. 99, Issue 1, pp. 25–38). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9291>
- DE ROOS, J., VANDAMME, P., & DE VUYST, L. (2018). **Wort substrate consumption and metabolite production during lambic beer fermentation and maturation explain the successive growth of specific bacterial and yeast species**. Frontiers in Microbiology, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02763>

- DUARTE, I., BARROS, A., BELTON, P. S., RIGHELATO, R., SPRAUL, M., HUMPFER, E., & Gil, A. M. (2002). **High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2475–2481. <https://doi.org/10.1021/jf011345j>
- DYSVIK, A., La ROSA, S. L., BUFFETTO, F., LILAND, K. H., MYHRER, K. S., RUKKE, E. O., WICKLUND, T., & WESTERENG, B. (2020). **Secondary Lactic Acid Bacteria Fermentation with Wood-Derived Xylooligosaccharides as a Tool to Expedite Sour Beer Production**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(1), 301–314. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05459>
- DYSVIK, A., LEANTI, S., Rosa, L., DE ROUCK, G., RUKKE, E.-O., WESTERENG, B., & WICKLUND, T. (2020). **Microbial Dynamics in Traditional and Modern Sour Beer Production**. <https://doi.org/10.1128/AEM>
- DYSVIK, A., LILAND, K. H., MYHRER, K. S., WESTERENG, B., RUKKE, E. O., de ROUCK, G., & WICKLUND, T. (2019). **Pre-fermentation with lactic acid bacteria in sour beer production**. *Journal of the Institute of Brewing*, 125(3), 342–356. <https://doi.org/10.1002/jib.569>
- GELADI, P., & ESBENSEN, K. (1990). **The start and early history of chemometrics: Selected interviews. Part I**. In *Interviews (J. Chemometrics (Vol. 4))*.
- HOTELLING, H. (n.d.). **Analysis of a complex of statistical variables into principal components**. In: *Determination of principal components for individuals. (iii) Beer Composition and Properties Abstract*. (2009).
- JEONG, J. H., CHO, S. J., & KIM, Y. (2017). **High-Resolution NMR Spectroscopy for the Classification of Beer**. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 38(4), 466–470. <https://doi.org/10.1002/bkcs.11113>
- KHATIB, A., WILSON, E. G., KIM, H. K., LEFEBER, A. W. M., ERKELENS, C., CHOI, Y. H., & VERPOORTE, R. (2006). **Application of two-dimensional J-resolved nuclear magnetic resonance spectroscopy to differentiation of beer**. *Analytica Chimica Acta*, 559(2), 264–270. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.064>
- KLAMPFL, C. W. (1999). **Analysis of organic acids and inorganic anions in different type of beer using capillary zone electrophoresis**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 987–990. <https://doi.org/10.1021/jf9808168>
- KOWALSKI, B. R. (1975). **Chemometrics: Views and Propositions?** In *Journal of Chemical Information and Computer Sciences (Vol. 15, Issue 4)*.
- KOWALSKI, B. R. (1978). **Chemometrics. In Analytical Letters (Vol. 11, Issue 10, pp. xi–xiii)**. <https://doi.org/10.1080/00032717808059728>
- KROGERUS, K., & GIBSON, B. R. (2013). **125th anniversary review: Diacetyl and its control during brewery fermentation**. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 86–97. <https://doi.org/10.1002/jib.84>

KUMARA, H. M. C. S., DE CORT, S., & VERACHTERT, H. (1993). **Localization and Characterization of ac-Glucosidase Activity in *Brettanomyces lambicus***. In APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY.

KUMARA, H. M. C. S., & VERACHTERT, H. (1991). **Identification of lambic superattenuating micro-organisms by the use of selective antibiotic**. Journal of the Institute of Brewing, 97(3), 181–185. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1991.tb01064.x>

LE GALL, G., & COLQUHOUN, I. J. (2003). **NMR spectroscopy in food authentication**. In **Food Authenticity and Traceability** (pp. 131–155). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9781855737181.1.131>

LIU, S. Q. (2015). **Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour**. In **Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste** (pp. 357–374). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00017-4>

MENONCIN, M., & BONATTO, D. (2019). **Molecular and biochemical aspects of *Brettanomyces* in brewing**. In Journal of the Institute of Brewing (Vol. 125, Issue 4, pp. 402–411). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jib.580>

MITCHELL, D., & STRONG, G. (n.d.). **Overview of Changes Between the 2015 and 2021 BJCP Beer Style Guidelines**.

MONAKHOVA, Y. B., KUBALLA, T., & LACHENMEIER, D. W. (2013). **Chemometric methods in NMR spectroscopic analysis of food products**. In Journal of Analytical Chemistry (Vol. 68, Issue 9, pp. 755–766). <https://doi.org/10.1134/S1061934813090098>

MONTANARI, L., PERRETTI, G., NATELLA, F., GUIDI, A., FANTOZZI, P., & FANTOZZI, P. (1999). **Organic and Phenolic Acids in Beer** (Vol. 32). <http://www.idealibrary.com>

NARDINI, M. (2023). **An Overview of Bioactive Phenolic Molecules and Antioxidant Properties of Beer: Emerging Trends**. In *Molecules* (Vol. 28, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules28073221>

NORD, L. I., VAAG, P., & DUUS, J. (2004). **Quantification of organic and amino acids in beer by ¹H NMR spectroscopy**. *Analytical Chemistry*, 76(16), 4790–4798. <https://doi.org/10.1021/ac0496852>

PALMIOLI, A., ALBERICI, D., CIARAMELLI, C., & AIROLDI, C. (2020). **Metabolomic profiling of beers: Combining ¹H NMR spectroscopy and chemometric approaches to discriminate craft and industrial products**. *Food Chemistry*, 327. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127025>

PEARSON, K. (1901). LIII. **On lines and planes of closest fit to systems of points in space**. The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science, 2(11), 559–572. <https://doi.org/10.1080/14786440109462720>

PIRES, E. J. (2015). **Biochemistry of beer fermentation**. <http://www.springer.com/series/10196>

POSTIGO, V., GARCÍA, M., & ARROYO, T. (2023). **Study of a First Approach to the Controlled Fermentation for Lambic Beer Production**. *Microorganisms*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11071681>

RODRIGUES, J. A., BARROS, A. S., CARVALHO, B., BRANDÃO, T., & Gil, A. M. (2011). **Probing beer aging chemistry by nuclear magnetic resonance and multivariate analysis**. *Analytica Chimica Acta*, 702(2), 178–187. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.06.042>

RODRIGUES, J. E. A., ERNY, G. L., BARROS, A. S., ESTEVES, V. I., BRANDÃO, T., FERREIRA, A. A., CABRITA, E., & GIL, A. M. (2010). **Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods**. *Analytica Chimica Acta*, 674(2), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.029>

SAVORANI, F., TOMASI, G., & ENGELSEN, S. B. (2010). **icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra**. *Journal of Magnetic Resonance*, 202(2), 190–202. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2009.11.012>

SOUSA, S. A. A., MAGALHÃES, A., & FERREIRA, M. M. C. (2013). **Optimized bucketing for NMR spectra: Three case studies**. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 122, 93–102. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.01.006>

SPITAEELS, F., VAN KERREBROECK, S., WIEME, A. D., SNAUWAERT, I., AERTS, M., VAN LANDSCHOOT, A., DE VUYST, L., & VANDAMME, P. (2015). **Microbiota and metabolites of aged bottled gueuze beers converge to the same composition**. *Food Microbiology*, 47, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.10.004>

SKOV, T., VAN DEN BERG, F., TOMASI, G., & BRO, R. (2006). **Automated alignment of chromatographic data**. *Journal of Chemometrics*, 20(11–12), 484–497. <https://doi.org/10.1002/cem.1031>

TOMASI, G., VAN DEN BERG, F., & ANDERSSON, C. (2004). **Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data**. *Journal of Chemometrics*, 18(5), 231–241. <https://doi.org/10.1002/cem.859>

VAN DUYNHOVEN, J., VODA, A., WITEK, M., & VAN AS, H. (2010). **Time-domain NMR applied to food products**. In *Annual Reports on NMR Spectroscopy* (Vol. 69, Issue C, pp. 145–197). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0066-4103\(10\)69003-5](https://doi.org/10.1016/S0066-4103(10)69003-5)

VAN OEVELEN, D., SPAEPEN, M., TIMMERMANS, P., & VERACHTERT, H. (1977) **Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze.** Journal of the Institute of Brewing, 83(6), 356–360.
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1977.tb03825.x>