

MARIANE MARTINS AZEVEDO

**CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE CERVEJA E DE DESTILADO DE
CERVEJA E DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE TRIAGEM SIMPLES
PARA DETERMINAÇÃO DE DIETILENOGLICOL POR CROMATOGRAFIA
GASOSA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz

Coorientadores: Alexandre Fontes Pereira
André Fernando de Oliveira

**VIÇOSA- MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

A994c
2022

Azevedo, Mariane Martins, 1990-

Caracterização da composição de cerveja e de destilado de
cerveja e desenvolvimento de um método de triagem simples
para determinação de dietilenoglicol por cromatografia gasosa /
Mariane Martins Azevedo. – Viçosa, MG, 2022.

1 tese eletrônica (120 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Química, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.637>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Cromatografia a gás. 2. Cerveja - Composição.
I. Queiroz, Maria Eliana Lopes Ribeiro de, 1958-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química.
Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. III. Título.

CDD 22. ed. 543.85

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB-6/3317

MARIANE MARTINS AZEVEDO

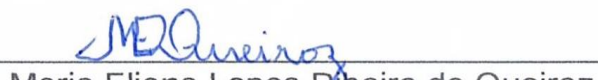
CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE CERVEJA E DE DESTILADO DE CERVEJA E DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO DE TRIAGEM SIMPLES PARA DETERMINAÇÃO DE DIETILENOGLICOL POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 25 de julho de 2022.

Assentimento:


Mariane Martins Azevedo
Autora


Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz
Orientadora

A meus pais, aos meus avós,
e aos meus irmãos.

Com todo o meu amor,
dedico esse trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo amparo e força para chegar até aqui e à Nossa Senhora pela sua intercessão.

À minha mãe, Maria Ivane, pelo incentivo e amor incondicional. Você fez de mim, tudo o que sou hoje. Ao meu pai pelo amor, carinho e incentivo. Aos meus irmãos, Felipe e Izadora e ao meu namorado, Alexandre. Aos meus avós (vó Biga, vó Aparecida, vô João-*in memorian* e vô Valdir- *in memorian*). Aos tios e primos pelo incentivo e apoio de sempre.

À professora Maria Eliana pelo acolhimento, ensinamentos e amizade. A senhora foi muito importante para meu aprendizado. Aos professores André Fernando e Alexandre Fontes pela orientação e amizade. À Liany que se dedicou juntamente comigo nesse trabalho e ao professor Antonio Augusto pela participação na banca e pelas contribuições ao meu trabalho.

Aos amigos de Mimoso, Alegre, Viçosa e Niterói pelo incentivo e carinho de sempre, mesmo com a distância. Aos amigos do Laqua, de modo especial à Thais, Jéssika, Vitor e Aline pela ajuda e contribuições e aos amigos da agroquímica.

Agradeço de maneira geral, às pessoas que de certa forma incentivaram, contribuíram e acreditaram na realização dessa Tese.

À Universidade Federal de Viçosa pelo suporte para a realização desse trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

BIOGRAFIA

Mariane Martins Azevedo, filha de Maria Ivane da Silva Martins e Valci da Silva Azevedo, nascida em 02 de janeiro de 1990, na cidade de Mimoso do Sul no Espírito Santo.

Em 05 de agosto de 2009, iniciou-se o curso de Licenciatura em Química na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) no município de Alegre e diplomou-se em outubro de 2013. Em março de 2014, iniciou o mestrado no programa de pós-graduação em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa (UFV), e submeteu-se a defesa em março de 2016. Em agosto de 2017, iniciou o doutorado no programa de pós-graduação em Agroquímica na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Em dezembro de 2020 iniciou-se na carreira profissional trabalhando na empresa Synvia. Em junho de 2022, começou a trabalhar na EMS. Em julho de 2022, submetendo-se a defesa da tese de doutorado.

RESUMO

AZEVEDO, Mariane Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2022. **Caracterização da composição de cerveja e de destilado de cerveja e desenvolvimento de um método de triagem simples para determinação de dietilenoglicol por cromatografia gasosa.** Orientador: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Coorientadores: Alexandre Fontes Pereira e André Fernando de Oliveira.

A cerveja e o destilado da cerveja são amostras muito complexas e para analisar esse tipo de matriz por cromatografia gasosa (GC) é necessário um pré-tratamento das amostras. A microextração em fase sólida no headspace (HS-SPME) é umas dessas técnicas de pré-tratamento mais utilizadas para a determinação da composição voláteis dos alimentos. Além dos compostos voláteis, a presença de compostos semi-voláteis nessas matrizes também deve ser investigada. Portanto, os objetivos deste trabalho foram caracterizar uma cerveja e um destilado de cerveja por GC usando a técnica HS-SPME, propor diferentes técnicas de preparo de amostra para extração de compostos da cerveja, bem como otimizar e validar um método de triagem para análise de Dietilenoglicol (DEG). O método HS-SPME com análise por GC equipado com um detector por ionização em chama (GC-FID) possibilitou a extração e análise de 8 compostos voláteis da cerveja e do destilado de cerveja. Ao considerar o estudo com diferentes técnicas de extração com análise por GC-MS em amostras de cerveja, ao utilizar a HS-SPME, foi identificado 14 compostos, com a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) foi possível identificar 32 compostos na cerveja, enquanto que a hifenção das técnicas LLE/LTP com a DLLME (microextração líquido-líquido dispersiva) permitiu identificar 53 compostos nos diferentes ensaios otimizados, as mesmas extraíram diferentes compostos em sua maioria e a melhor técnica a ser utilizada vai depender do grupo funcional do composto a ser identificado. Já o estudo para a determinação de dietilenoglicol (DEG) em amostras de cerveja um método de triagem empregando a LLE/LTP e análise por GC-FID foi otimizado, validado, aplicado em 28 amostras de cervejas, e as amostras consideradas suspeitas, analisadas por GC-MS detectou o DEG em três dessas amostras, na qual apenas uma estava acima do limite de quantificação.

Palavras-chave: Cerveja. Compostos voláteis e não voláteis. Dietilenoglicol. Preparo de amostra. Cromatografia gasosa.

ABSTRACT

AZEVEDO, Mariane Martins, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2022. **Characterization of beer and beer distillate composition and development of a simple screening method for determination of diethylene glycol by gas chromatography.** Advisor: Maria Eliana Lopes Ribeiro de Queiroz. Co-advisors: Alexandre Fontes Pereira and André Fernando de Oliveira.

Beer and beer distillate are very complex samples and to analyze this type of matrix by gas chromatography (GC) it is necessary to pre-treat the samples. Headspace solid phase microextraction (HS-SPME) is one of the most used pretreatment techniques for determining the volatile composition of foods. In addition to volatile compounds, the presence of semi-volatile compounds in these matrices should also be investigated. Therefore, the objectives of this work were to characterize a beer and a beer distillate by GC using the HS-SPME technique, to propose different sample preparation techniques for extracting compounds from beer, as well as to optimize and validate a screening method for analysis of Diethylene glycol (DEG). The HS-SPME method with GC analysis equipped with a flame ionization detector (GC-FID) allowed the extraction and analysis of 8 volatile compounds from beer and beer distillate. When considering the study with different extraction techniques with GC-MS analysis in beer samples, when using HS-SPME, 14 compounds were identified, with liquid-liquid extraction with low temperature partition (LLE/LTP) it was possible identify 32 compounds in beer, while the hyphenation of LLE/LTP techniques with DLLME (dispersive liquid-liquid microextraction) allowed to identify 53 compounds in the different optimized assays, they extracted mostly different compounds and the best technique to be used will depend on the functional group of the compound to be identified. As for the study for the determination of diethylene glycol (DEG) in beer samples, a screening method using LLE/LTP and GC-FID analysis was optimized, validated, applied to 28 beer samples, and samples considered suspicious were analyzed by GC-MS detected DEG in three of these samples, of which only one was above the limit of quantification.

Keywords: Beer. Volatile and non-volatile compounds. Diethylene glycol. Sample preparation. Gas chromatography.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	12
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
Importância econômica da cerveja.....	16
Processo de fabricação da Cerveja.....	17
Flavours e Off-Flavours presentes na cerveja.....	19
Resíduos produzidos pelas fábricas de cerveja	20
Destilados de resíduos.....	22
Método de extração.....	23
1. Microextração em fase sólida (SPME)	23
2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	24
3. Extração líquido-líquido por partição a baixa temperatura (LLE/LTP)	26
4. Hifenção de técnicas com a DLLME	27
Análise por cromatográfica e seus diferentes detectores	28
REFERÊNCIAS.....	30
OBJETIVOS	38
Objetivo Geral	38
Objetivos específicos:	38
CAPÍTULO 1. CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE CERVEJA PILSEN E DESTILADO DE CERVEJA POR CROMATOGRAFIA GASOSA	39
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAIS E MÉTODOS	44
2.1. Reagentes e soluções.....	44
2.2. Instrumentos e aparelhos.....	44
2.3. Amostras	45
2.4. Microextração em fase sólida (SPME)	46
2.5. Análise de soluções padrão de compostos presentes na cerveja e no destilado de cerveja	47
2.5.1. Estudo do efeito <i>Salting out</i>	47
2.6. Condições Cromatográficas	48
2.6.1. Condições cromatográficas da análise qualitativa de compostos voláteis extraídos por HS-SPME usando o GC-MS	48

2.6.2. Condições cromatográficas da análise dos compostos voláteis extraídos por HS-SPME utilizando o GC-FID.....	49
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	50
3.1. Produção do Destilado	50
3.2. Avaliação qualitativa preliminar do perfil volátil dos compostos presentes na cerveja e no destilado de cerveja usando o HS-SPME-GC-MS.....	50
3.3. Análise de soluções padrão dos principais compostos presentes na cerveja e no destilado de cerveja usando a HS-SPME-GC-MS e a HS-SPME-GC/FID.....	51
3.3.1. Efeito <i>Salting-Out</i>	52
3.4. Avaliação comparativa do perfil volátil da cerveja durante as etapas da fabricação do destilado de cerveja.....	54
4. CONCLUSÃO	58
5. REFERÊNCIAS	59
CAPÍTULO 2. EMPREGANDO DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE CERVEJA.....	61
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. MATERIAIS E MÉTODOS	63
2.1. Reagentes e soluções.....	63
2.2. Amostras	63
2.3. Instrumentos e aparelhos.....	64
2.4. Condições cromatográficas.....	64
2.5. Extrações de compostos voláteis e semivoláteis na cerveja.....	65
2.5.1. Microextração em fase sólida no <i>headspace</i> (HS-SPME).....	65
2.5.2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	66
2.5.3. Otimização da extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP)	66
2.5.3.1. Efeito da adição de NaCl na extração de compostos de amostras de cerveja	66
2.5.4. Extração líquido-líquido com partição em baixa (LLE/LTP) hifenada a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	68
3.1. Microextração em fase sólida no <i>headspace</i> (HS-SPME).....	68
3.1.1. Tipos de fibras	69
3.1.2. Temperaturas de extração.....	71
3.2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)	72

3.3. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) e análise de cervejas por GC-MS	73
3.4. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura hifenada com a microextração líquido-líquido dispersiva (LLE/LTP-DLLME).....	81
3.5. Perfil de compostos voláteis e semi-voláteis na cerveja	88
4. CONCLUSÃO	90
1. INTRODUÇÃO.....	95
2. MATERIAIS E MÉTODOS	98
2.1. Reagentes e soluções.....	98
2.2. Amostras	98
2.3. Instrumentos e aparelhos.....	98
2.4. Condições cromatográficas.....	99
2.5. Otimização da extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (LLE/LTP).....	100
2.6. Análise univariada usando sais na extração do DEG em amostras de cerveja	100
2.7. Análise multivariada avaliando os efeitos do sal e do solvente extrator (ACN:ACT) na extração do DEG em amostras de cerveja	101
2.8. Validação	102
2.8.1. Seletividade	102
2.8.2. Efeito de Matriz.....	103
2.8.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	103
2.8.4. Linearidade do método	103
2.8.5. Precisão e Exatidão.....	104
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	105
3.1. Otimização da extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP).....	105
3.2. Validação	109
3.1.1. Seletividade	109
3.1.2. Efeito de Matriz.....	110
3.1.3. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	111
3.1.4. Linearidade da faixa de trabalho.....	111
3.1.5. Exatidão e precisão	114
4. Aplicação do método em amostras autênticas.....	114
5. CONCLUSÕES.....	117

6. REFERÊNCIAS	118
----------------------	-----

INTRODUÇÃO

A origem das primeiras cervejas é incerta, mas há estudos que comprovam que ocorreu há mais de 6000 anos (MORADO, 2017). A cerveja não é apenas conhecida por sua longa tradição ou seus ingredientes (malte/cevada, lúpulo, água e fermento), mas também por suas características únicas de qualidade, como a aparência e o sabor (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018).

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja, (CERVBRASIL, 2022) o mercado cervejeiro no país produz em média 14,1 bilhões de litros de cerveja anualmente e foi responsável, no ano de 2021, pelo faturamento de 160 bilhões de reais, o equivalente a 1,7% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. (CERVBRASIL, 2022) Considerando o crescimento econômico e a importância do mercado, os empreendedores têm que estar atentos à qualidade do produto visando à valorização da marca. (SEBRAE, 2022)

Os sabores das cervejas estão ligados aos compostos presentes nesse tipo de bebida, (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018) e influenciam significativamente no amargor da mesma. (CHARALAMBOUS, 1992; OLANIRAN; HIRALAL; MOKOENA, 2017) Esse aroma da cerveja pode ser modificado de acordo com alterações no processo de fabricação e armazenamento, o que pode provocar um gosto desagradável na bebida, os chamados *off-flavours*. (CHARALAMBOUS, 1992; HUMIA et al., 2019) Quando uma cerveja não está dentro dos padrões estabelecidos devido aos *off-flavours*, a mesma é descartada causando um prejuízo de milhões para a empresa, além de uma série de resíduos e acúmulo de lixo. (MESTRE CERVEJEIRO, 2011) Considerando esses fatores, destilar as cervejas que por algum motivo estejam fora do padrão seria uma alternativa que permitiria dar um destino para essa cerveja, minimizando prejuízos, além de diminuir a poluição do meio ambiente causada pelas fábricas de cerveja. Levando em consideração que a fabricação do destilado, a partir de resíduos, é uma proposta inovadora, estudar a eficácia desse processo e caracterizar o destilado obtido fazendo a determinação e a quantificação dos compostos presentes em sua composição é importante.

A cromatografia gasosa tem sido muito utilizada para análises de compostos em cerveja. (PINHO; FERREIRA; SANTOS, 2006; STEFANUTO et al., 2018; ZANELLA et al., 2021). Um fator importante a ser verificado é a seleção do detector,

sendo os principais o GC/FID e GC-MS. Essa seleção, no entanto, não deve ser apenas influenciada pelo fator de custo instrumental ou pela disponibilidade para identificação dos compostos, mas também considerando o método de análise com medições confiáveis.(APARICIO-RUIZ et al., 2018)

Cerveja e bebidas destiladas são amostras complexas, necessitando de um pré-tratamento da amostra que tenha como objetivo isolar os compostos de interesse antes da realização da análise. A microextração em fase sólida no *headspace* (HS-SPME) em combinação com a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) tem se tornado atualmente o principal método implementado para a determinação da composição de voláteis em diversos alimentos e bebidas, como a cerveja. (KISHIMOTO et al., 2018; PINHO; FERREIRA; SANTOS, 2006; STEFANUTO et al., 2018) Saber a composição dos perfis voláteis pode ser considerado uma estratégia que permite a autenticação da cerveja, uma vez que os componentes variam de acordo com a matéria-prima e a tecnologia empregada para sua fabricação.

Além dos compostos voláteis, a presença de compostos não voláteis e contaminantes na cerveja, como o Dietilenoglicol (DEG), também devem ser investigados. Uma alternativa para extração dos compostos da cerveja é a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME). (ALMEIDA; FERNANDES; CUNHA, 2012; PANG et al., 2017; RODRÍGUEZ-CÁCERES et al., 2017) A DLLME possui méritos como simplicidade, facilidade de operação, rapidez, alto fator de enriquecimento, baixo custo e uso de pequenos volumes de solventes orgânicos.(PANG et al., 2017; ZHOU, Q.; PANG; XIAO, 2009)

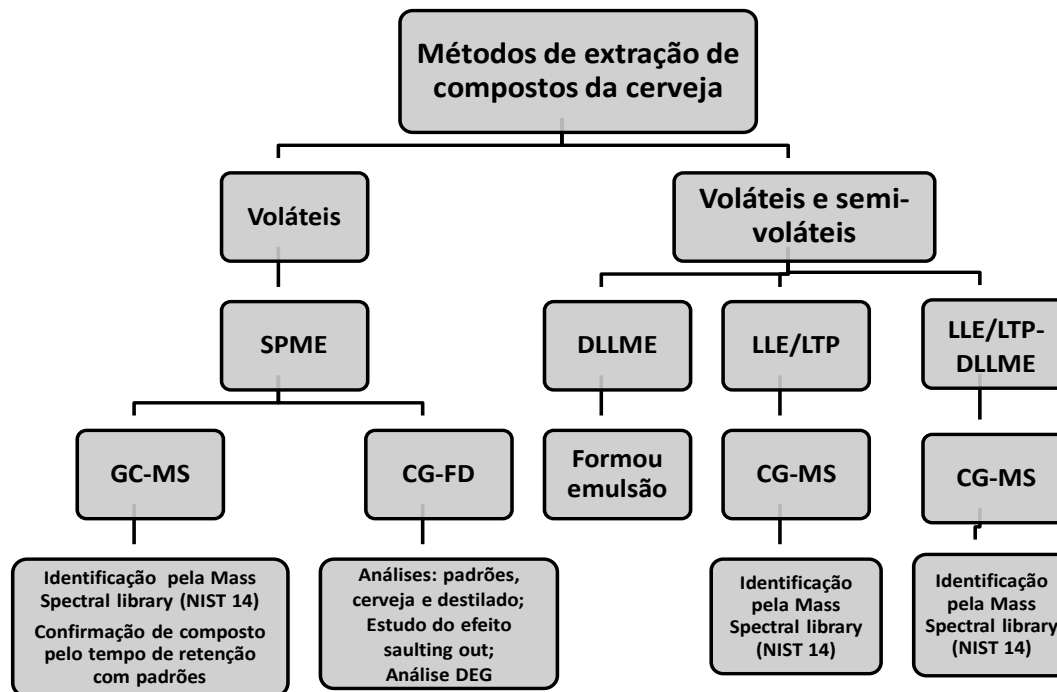
Outra alternativa para extração dos compostos da cerveja é a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP). Essa técnica pode ser considerada prática e com número de etapas reduzido, tornando-a, assim, de fácil execução mesmo considerando o tempo necessário para congelamento das misturas. Muitas vezes, os extratos são limpos e com isso não há a necessidade de uma etapa de "clean up", mesmo quando as matrizes aquosas são mais complexas. O único inconveniente do método é não permitir a pré-concentração da amostra. (GOULART et al., 2008; VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007) Uma maneira de minimizar essa desvantagem é incluindo uma etapa de evaporação do solvente (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007) ou a hifenação com outras técnicas, como a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), uma vez que a DLLME pode ser usada para a pré-

concentração dos analitos, quando hifenadas com outra técnica. Desse modo, hifenar a LLE/LTP com a DLLME pode ser considerada uma ótima opção para se obter melhores resultados nas análises.

Em função do exposto, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar os principais compostos presentes em cervejas, assim como destilar uma determinada cerveja e caracterizar a composição química desse destilado. O trabalho também visou otimizar diferentes métodos de extração para determinação dos compostos presentes na cerveja por cromatografia gasosa, assim como otimizar, validar e aplicar um método simples, eficaz e de baixo custo para a determinação de dietilenoglicol em amostras de cerveja.

Na Figura 1, tem-se o esquema dos estudos propostos nesse trabalho, incluindo os métodos de extração e de análise empregados.

Figura 1. Diagrama dos métodos de extração e análise usados para a identificação dos compostos de cerveja.



REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A origem das primeiras cervejas é duvidosa, mas essa pode ser considerada uma das bebidas mais antigas no mundo, sendo os relatos mais antigos dos povos Sumérios há 6000 anos (atual região ao sul do Iraque). (HORNSEY; BREWERY, 2016)

Relatos históricos mostram a importância da cerveja na antiguidade. Exemplo que comprovam essa importância relatam que 40% dos grãos produzidos pelos sumérios eram destinados às casas de cerveja. (MÜLLER, 2012) Já no império da Mesopotâmia (que sucedeu o Sumério) mostra a importância da cerveja para aquela região na época, uma vez que previa o afogamento do cervejeiro em sua própria bebida se a mesma não houvesse qualidade. Já na Babilônia, o cervejeiro era dispensado das obrigações do serviço militar, para poder assim, abastecer o exército com a bebida. (MORADO, 2017)

Inicialmente a cerveja foi considerada uma bebida nutritiva e era servida como alimento e foi se popularizando pela praticidade de fabricação e armazenamento, por ser uma bebida socializante, abundante e barata. (MORADO, 2017) Por conta do seu efeito inebriante, logo se tornou importante nos ritos religiosos, uma vez que a sensação da euforia da embriaguez fez com que as pessoas correlacionassem à bebida a aspectos místicos. (MEUSSDOERFFER, 2009)

A cerveja recebeu vários nomes ao longo da história. Foi na Gália (região francesa povoada por Gauleses) que a cerveja recebeu o nome latino que tem hoje, chamada de *cerevisia* ou *cervisia*, em homenagem a Ceres, deusa da colheita e da fertilidade. Os sumérios a chamavam de *sikaru*, os chineses de *tsio* e os egípcios de *zythum*. (MORADO, 2017; POELMANS; SWINNEN, 2009)

Importância econômica da cerveja

Apesar da cerveja não ter surgido na Europa, foi nesse continente que o processo de produção dessa bebida se desenvolveu a partir do século XII e desde então, a produção da mesma tem sido um negócio promissor. (HORNSEY; BREWERY, 2016; NACHEL; ETTLINGER, 2019) A República Tcheca é o principal consumidor per capita de cerveja no mundo, com um consumo anual de 142,4 litros de cerveja, em média, por pessoa. Já a China, Estados Unidos e Brasil são

respectivamente os maiores produtores de cerveja. (WORLD POPULATION REVIEW, 2022)

De acordo com a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CervBrasil) o mercado cervejeiro no Brasil foi responsável pelo faturamento de 160 bilhões de reais no ano de 2020, o equivalente a 1,7% do PIB nacional. A produção média anual de produção de cerveja no país é de 14,1 bilhão de litros de cerveja e esse número só tende a crescer uma vez que em julho de 2019 atingiu a marca de 1000 cervejarias e no final de 2020, atingiu 1383 cervejarias. Em se tratando de registro de produtos, 2018 apresentou o maior número de registros, sendo concedidos, aproximadamente, 6.800 registros de produtos para cerveja/chope. (CERVBRASIL, 2022)

Processo de fabricação da Cerveja

Os mosteiros foram os responsáveis pelos primeiros estudos sobre cerveja, uma vez que os religiosos eram alfabetizados e aprimoraram o método de fabricação e o processo de conservação a frio da bebida. (POELMANS; SWINNEN, 2012)

A cerveja é uma bebida resultante da fermentação alcoólica. Geralmente é feita do malte de cevada com a adição de lúpulo, composta por 91% de água. Tanto o álcool quanto o gás carbônico são importantes para o processo natural da fermentação da cerveja, sendo o CO₂ um componente essencial para a formação da espuma responsável pela conservação e manutenção do sabor natural da cerveja. (MÜLLER, 2012)

A Figura 2 ilustra de forma esquematizada o processo de produção da cerveja em uma indústria, o que apesar de ser simples, requer muito conhecimento e prática.

Figura 2. Esquema do processo de produção de cerveja.



Fonte: (GALVÃO, 1997)

A primeira etapa para a fabricação da cerveja é a moagem, que tem por finalidade quebrar a casca da cevada para expor o endosperma dos grãos. Os grãos moídos são então colocados em um tanque com água quente e deixados em repouso, processo esse denominado de brassagem. Forma-se então um líquido denominado mosto. (PEREIRA, A. F., 2021) Depois disso, uma filtração é realizada, separando assim, o mosto dos grãos de cevada. (MORADO, 2017)

O líquido é fervido em um tanque e nessa etapa lúpulos são adicionados. O Lúpulo é uma flor em formato de pinho que contém a lupulina, uma substância viscosa que é secretada quando fervida e proporciona a cerveja seu amargor, sabor, aroma e ajuda na conservação da cerveja. Essa etapa visa o equilíbrio do sabor doce do mosto com o amargo do lúpulo, o chamado amargor. (FERREIRA, 2009)

O amargor então é filtrado e é realizado o preparo da adição da levedura. Com a adição da levedura, o líquido é adicionado a um fermentador e a chamada fermentação ocorre. (NACHEL; ETTLINGER, 2019)

Após este período de 5 a 10 dias do processo de fermentação, a temperatura é baixada para zero grau, por alguns dias, fazendo com que a levedura fique totalmente inativa e a decante para o fundo do fermentador o que torna a cerveja mais límpida e mais clara. Esse processo é conhecido como maturação. (PEREIRA, A. F., 2021) Depois tem-se os processos de acabamento da fabricação da cerveja que

engloba: a filtração para um acabamento brilhante da cerveja e eliminação de leveduras; armazenamento ou carbonatação injetando CO₂ caso a cerveja apresente quantidade menor desse gás; envase que é a fase de embalagem e despacho e distribuição. (MORADO, 2017)

Flavours e Off-Flavours presentes na cerveja

A cerveja é uma mistura complexa de compostos químicos, na qual, vários desses compostos que podem afetar a qualidade do sabor final da cerveja já foram identificados. (GIANNETTI et al., 2019)

Os compostos voláteis é geralmente responsáveis por várias notas de sabor na cerveja. (HUMIA et al., 2019). Eles podem ser provenientes de ingredientes, como malte de cevada e lúpulo, de malte torrado e mosto de ebulição, ou do subproduto do metabolismo de levedura durante a fermentação. Pode estar relacionado a aromas desagradáveis pela contaminação por micro-organismos e por condições inadequadas de armazenamento. (HUMIA et al., 2019)

Os compostos voláteis são formados principalmente por álcoois alifáticos e aromáticos, ésteres, ácidos orgânicos, aldeídos, compostos carbonílicos, e substâncias terpênicas. (HUMIA et al., 2019; MARTINEZ-GOMEZ; CABALLERO; BLANCO, 2020).

A cerveja contém vários tipos de álcool. O álcool mais importante na cerveja é o etanol seguido dos álcoois superiores. Foi relatado que o etanol exibe um sabor amargo (HO et al., 2013) enquanto o álcool fenilético uma essência semelhante a rosa (OUYANG et al., 2016). O 2-feniletanol é um produto do metabolismo da levedura e pode ser considerado um marcador para os parâmetros de fermentação. (CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2003; OSORIO-PAZ; BRUNAUER; ALAVEZ, 2019) Um estudo do conteúdo fenólico de vários tipos de cerveja, incluindo ale, bock, lager e pilsner, descobriram que o conteúdo total de compostos fenólicos varia muito entre eles. (PIAZZON; FORTE; NARDINI, 2010)

Os grupos de ésteres são frequentemente caracterizados por um sabor próprio de fruta. O octanoato de etila, decanoato de etila são marcados por possuírem “sabor de maçã”; enquanto o acetato de 3-metilbutila (acetato de isoamila) é caracterizado por uma nota de “sabor de banana” e o acetato de feniletila por ter “aroma de mel, frutado”. (CASTRO; ROSS; VIXIE, 2015) Em particular, Viana et al.

concluíram que ésteres etílicos podem transmitir um odor desagradável de vinagre azedo quando o nível de sabor limite for ultrapassado. (VIANA et al., 2008) Exemplo disso é o acetato de etila que tem um cheiro característico de esmalte de unha/acetona, desempenhando um papel fundamental no sabor da cerveja, mas pode ser considerado um off-flavour em concentrações elevadas. (VANDERHAEGEN et al., 2003)

Os ácidos carboxílicos responsáveis por odores específicos de frutas, queijo e gordura contribuem para o amargor, adstringência e ranço da bebida. O ácido octanoico (ou ácido caprílico) e o hexanoato de etila (éster de ácido caprílico) contribuem para dar sabor às bebidas alcoólicas com notas rançosas. (GIANNETTI et al., 2019). Já o ácido acético tem gosto associado a vinagre, podendo ser um off-flavours em concentrações elevadas, causadas pela contaminação de bactérias acéticas. Outro ácido é o ácido láctico que tem sabor característico de azedo e é produzido por bactérias contaminantes durante a fermentação e armazenamento ou no processo de embalagem da cerveja sendo considerado um off-flavour em concentrações elevadas. (LIU, S.-Q., 2015)

O notável aumento nos níveis de aldeídos voláteis é considerado paralelo ao desenvolvimento do sabor oxidado. O acetaldeído tem sabor e aroma de maçãs verdes. É produzido pelas leveduras, sendo precursor para a formação de álcool. Também pode ser um produto da oxidação do álcool, sendo um produto da terminação prematura da fermentação ou pela contaminação de bactérias acéticas. (LIU, S.-Q., 2015)

Durante o armazenamento da cerveja, as concentrações de alguns componentes do sabor podem aumentar e alguns novos componentes podem ser encontrados. Esses são geralmente referidos como "sabor oxidado", "sabor de papel" ou "sabor de papelão" resulta da oxidação de componentes da cerveja. (CHARALAMBOUS, 1992).

Resíduos produzidos pelas fábricas de cerveja

O mercado cervejeiro tem ganhado cada vez mais destaque no Brasil. O país conta atualmente com mais de mil cervejarias, com uma marca de que, aproximadamente, a cada dois dias uma cervejaria é aberta no Brasil. (MARCUSO; MÜLLER, 2018) Levando em consideração o crescimento econômico e a importância

do mercado, os empreendedores têm que estar atentos a valorização de sua marca, principalmente ao adotar práticas sustentáveis que visem o bem do planeta e redução de custos. Esses fatores aumentam a competitividade, uma vez que os consumidores têm se importado cada vez mais com marcas que pensem no meio ambiente. (DEVOLLI et al., 2018)

Empresas sustentáveis são aquelas que levam em consideração a emissão de carbono, o consumo de água e de produtos químicos, o descarte de resíduos sólidos e os riscos à saúde de funcionários, fornecedores e clientes. Para obter esse título as empresas necessitam de informações e formas de inovar. Várias cervejarias já vêm adotando prática sustentáveis, como a cervejaria Edelbrau, que tem implementado um sistema de reaproveitamento da água usada no resfriamento do mosto. (EDELBRAU, 2022) Outras cervejarias vêm adotando algumas outras práticas como utilizar um sistema de lavagem automático ao invés de um sistema manual por ser mais eficiente para a economia de água. (ASHRAF; RAMAMURTHY; RENE, 2021; DEVOLLI et al., 2018)

No processo de fabricação da cerveja, grande parte dos resíduos são grãos restantes da elaboração do mosto. As sobras não podem ser reutilizadas para a fabricação, mas são ricas em proteínas, fibras e outros nutrientes, podendo ter outras finalidades, como ração para animais em fazendas (FILLAUDEAU; BLANPAIN-AVET; DAUFIN, 2006). Outras empresas investem na produção de calçados que levam em sua composição látex e resíduos de malte da cerveja. O bagaço é coletado após a produção da bebida e mesclado com o látex para a criação do solado. (BEER ART, 2022)

As cervejarias da Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CervBrasil) representam juntas 96% do mercado cervejeiro no país e possuem importantes projetos para preservação do meio ambiente. Nas grandes empresas do ramo cervejeiro, os subprodutos passaram a ser uma fonte de renda e com isso já registraram um índice de pelo menos 98% na reciclagem de resíduos na produção. Os resíduos de bagaços de malte são usados na alimentação de rebanho, o fermento e a levedura são reutilizados na fabricação de aromatizantes. Além disso, são promovidas ações como a redução do consumo de energia e de água e o tratamento de efluentes. (CERVBRASIL, 2022)

Os *off-flavours* são os principais e mais sérios problemas na indústria de cerveja, uma vez que os consumidores julgam o sabor do produto e quando essa

cerveja não está dentro dos padrões estabelecidos ela é descartada, causando prejuízo de milhões para a empresa. (CHARALAMBOUS, 1992; MESTRE CERVEJEIRO, 2011) Em função disso, dar uma destinação para essa cerveja que seria descartada é de suma importância tanto para o meio ambiente, quanto para as políticas de sustentabilidade das empresas, devido à redução de prejuízos causados por erros no processo de fabricação.

Destilados de resíduos

O processo de destilação é um dos meios de se fazer bebida com teor alcoólico acima das bebidas fermentadas. A destilação consiste em um processo de evaporação e condensação, na qual os líquidos são separados segundo a temperatura de ebulição das substâncias. (ROSENTRATER, 2018)

Vários trabalhos mostram estudos envolvendo a composição de destilados de vinho ou de uva. (ARRIETA-GARAY et al., 2014; DIEGUEZ; PENA; GOMEZ, 2005) Orujo, por exemplo, é uma bebida alcoólica tradicional produzida na Galiza (noroeste da Espanha) a partir de resíduos da indústria de vinhos, ao se fazer a destilação de bagaço de uva. Antes essa bebida era valorizada como um produto caseiro de caráter tradicional, ultimamente, o orujo tem sido produzido em destilarias artesanais pelo uso de alambiques de cobre e em destilarias industriais usando arraste de vapor, (ARRIETA-GARAY et al., 2014; DIEGUEZ; PENA; GOMEZ, 2005) devendo ser submetido a um processo de controle de qualidade. (DIEGUEZ; PENA; GOMEZ, 2005) Nesse sentido, López-Vázquez e colaboradores (2010) analisaram os compostos voláteis presentes em Orujo de Galicia e caracterizaram 33 compostos voláteis nessa bebida, o que permitiu avaliar a qualidade do destilado de uva. (LÓPEZ-VÁZQUEZ et al., 2010)

O Hoppy Gin ou London dry/gin é um tipo de destilado produzido a partir de cerveja. Para a produção do Hoppy Gin, a cerveja é destilada duas vezes, de forma a obter-se um produto com uma concentração alcoólica mais elevada. (PEREIRA, A. R. F. B., 2018) Com isso, destilar as cervejas que de alguma forma saíram do padrão e produzir um destilado seria de grande valia, assim como fazer a análise química dessa bebida.

Método de extração

1. Microextração em fase sólida (SPME)

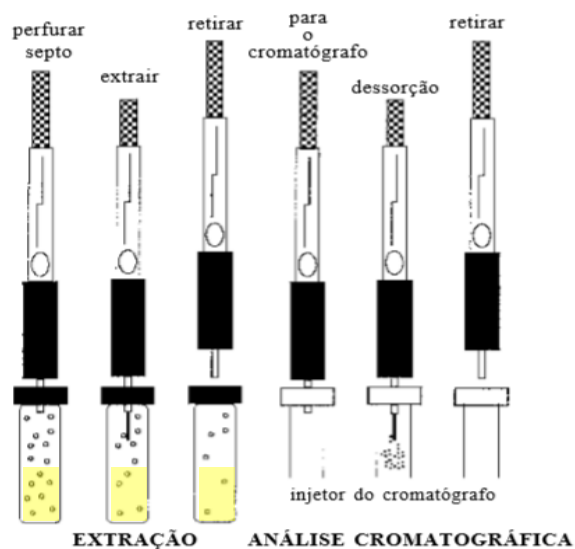
A microextração em fase sólida (SPME) é uma das principais técnicas empregadas para análise de compostos voláteis em diversas matrizes, incluindo a cerveja. (PINHO; FERREIRA; SANTOS, 2006; VIEJO et al., 2019) A SPME foi desenvolvida para a análise de micropoluentes orgânicos em água durante a última década do século XX, embora sua finalidade de aplicação tenha sido aprimorada para incluir várias outras matrizes (LANÇAS, 2003; PAWLISZYN, 2012), mostrando-se assim, uma alternativa aos métodos clássicos de extração. A SPME é uma técnica moderna de preparação de amostras que combina extração, concentração e introdução de amostras em uma única etapa. A SPME emprega uma fibra revestida por fase estacionária, que fica inserida em uma agulha em um dispositivo denominado “holder”. (XU; OUYANG, 2019)

Na SPME, a amostra é colocada em um frasco com tampa com rosca e septo. A fibra fica escondida dentro da agulha do dispositivo SPME que perfura o septo do frasco e com o movimento do êmbolo do holder, a fibra é exposta diretamente na amostra ou indiretamente. Quando a fibra é exposta indiretamente, esta é exposta no espaço acima da amostra (o chamado headspace do frasco, ou seja, a fibra é exposta sem entrar em contato com a amostra). Após o término da extração, ou seja, após atingir o equilíbrio de partição do soluto entre as fases, a fibra é novamente comprimida para o interior da agulha do dispositivo SPME e injetada no cromatógrafo. (QUEIROZ, 2009)

A escolha do modo de extração da SPME geralmente é baseada na composição da amostra e na volatilidade do soluto. A extração por headspace normalmente é o mais usado em relação ao modo direto, pois evita danos na fibra que podem ser provocados tanto pela dessorção não eficiente de substâncias de alta massa molar, quanto pelos reagentes adicionados às amostras para ajuste de pH ou força iônica. (QUEIROZ, 2009) Outra vantagem do modo indireto é o fato deste ser mais seletivo e gerar cromatogramas com pouca quantidade de interferentes uma vez que a fibra entra em contato com a fase gasosa, os solutos são removidos primeiro e com isso ocorre a extração indireta dos solutos da fase aquosa. (CHARRY-PARRA;

DEJESUS-ECHEVARRIA; PEREZ, 2011) A Figura 3 mostra o esquema de como a SPME é realizada desde a introdução na amostra até a análise cromatográfica.

Figura 3. Uso da HS-SPME para o processo de extração e o de dessorção do material extraído e análise por GC.



Fonte: Valente & Augusto, 2000.

As principais vantagens dessa técnica é a quantificação de compostos voláteis, em baixas concentrações, o que permitem alcançar baixos limites de detecção (ppb), e o não emprego de solventes orgânicos, que na maioria das vezes são tóxicos, são as principais vantagens dessa técnica. (MANYI-LOH; NDIP; CLARKE, 2011) Além disso, ela apresenta boa linearidade e requer preparação mínima da amostra. Outra vantagem é que a sensibilidade mais alta da técnica permite empregar menores volumes de amostra. (CHARRY-PARRA; DEJESUS-ECHEVARRIA; PEREZ, 2011)

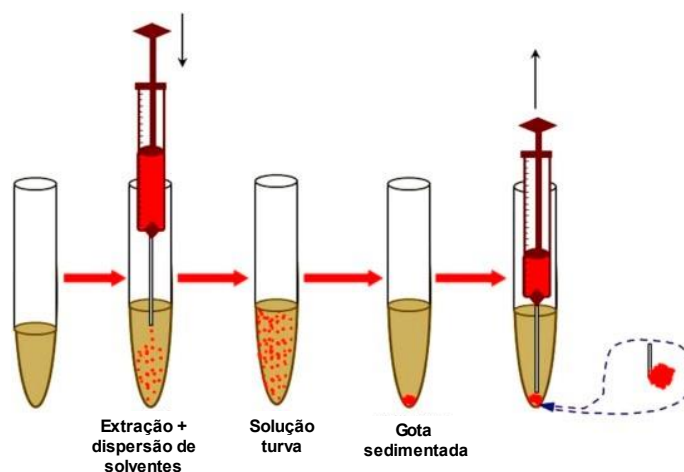
2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

A microextração líquido-líquido dispersiva foi introduzido pela primeira vez por Rezaee e colaboradores em 2006 para desenvolver a extração e a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em amostras de água. Foi baseada nos sistemas de solventes de componentes ternários (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010) como a extração líquido-líquido homogênea (EBRAHIMZADEH et al., 2007; FARAJZADEH et al., 2009) e a extração do ponto de nuvem, (LIU, J. et al., 2009;

LÓPEZ-MAYAN et al., 2020) consiste em uma fase aquosa, solvente dispersor e solvente de extrator.

A DLLME é uma técnica simples e rápida de microextração, apresentado alto fator de enriquecimento, baixo custo e baixo consumo de solventes orgânicos. (PANG et al., 2017) No método clássico, o solvente extrator usado deveria ser mais denso que a água, (JAIN; SINGH, 2016) como clorobenzeno, clorofórmio ou dissulfeto de carbono, e um solvente dispersor miscível nas fases extratora e aquosa, como metanol, acetonitrila ou acetona. (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010) A mistura extratora e o solvente dispersor são injetados na amostra, causando uma alta turbulência, o que causa a formação de pequenas gotículas dispersas na amostra aquosa. (JAIN; SINGH, 2016) Isso faz com que o estado de equilíbrio seja alcançado rapidamente, obtendo-se conseqüentemente a extração em curto intervalo de tempo. Após a centrifugação da solução turva, uma fase sedimentada se aloja no fundo do tubo usado para o procedimento e o extrato é retirado e analisado. (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010) Na Figura 6, tem-se a descrição do procedimento empregado para a extração com a DLLME.

Figura 6. Descrição do procedimento clássico utilizado para a extração usando a DLLME.



Fonte: Jain & Singh (2016).

Embora inicialmente a técnica utilizasse solventes de maior densidade que a da água, Farajzadeh *et al.* (2009) propôs a utilização de solventes menos densos como o ciclohexano ao fazer a extração de três pesticidas organofosforados em águas de torneira e de poço, obtendo valores de porcentagens de extração relativos entre 68 e 105%. Assim, a utilização de solventes não clorados e menos densos que a água foi ganhando cada vez mais adeptos. (PIMENTA et al., 2017; SARAJI et al., 2019)

A DLLME tem sido empregada como técnica de extração em análises de bebidas alcoólicas como vinho e cerveja. Contaminantes como pesticidas, (PANG et al., 2017) aminas, (ALMEIDA; FERNANDES; CUNHA, 2012) fenóis voláteis, (FARIÑA et al., 2007) compostos sulfurados, (JOFRE et al., 2010) compostos carbonílicos (RODRÍGUEZ-CÁCERES et al., 2017) e metais (TUZEN; PEKINER, 2015) têm sido determinados nesses tipos de amostras usando a DLLME. Pang e colaboradores (2017) propuseram um método para a análise de ésteres de organofosforados (OPEs) em vinho branco, vinho tinto e em cerveja de diferentes marcas usando a DLLME e cromatografia líquida de alta eficiência (UPLC). A DLLME também foi usada por Almeida e colaboradores (2012) para determinação simultânea de aminas biogênicas alifáticas, heterocíclicas e aromáticas em bebidas alcoólicas por GC-MS.

3. Extração líquido-líquido por partição a baixa temperatura (LLE/LTP)

A extração líquido-líquido (LLE) ainda é uma das técnicas de extração mais utilizadas para amostras líquidas. Apesar de ser considerada uma técnica simples, essa técnica necessita de especificidade, utiliza grandes volumes de solventes orgânicos, exige várias etapas, consome muito tempo e é difícil de ser totalmente automatizada. Considerando a consciência coletiva desenvolvida nos últimos anos sobre a redução no uso de solventes orgânicos, essa técnica tem sido modificada ou substituída por outras que minimizam ou eliminam esse problema. (LANÇAS, 2003)

Neste contexto uma técnica baseada na partição em baixa temperatura (extração líquido-líquido ou sólido-líquido com partição em baixa temperatura) vem sendo empregada para determinação de resíduos de pesticidas em amostras aquosas, (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007) vegetais (FREITAS et al., 2014; HELENO et al., 2019) e biológicas. (SILVA et al., 2022) Esta técnica foi inicialmente empregada para efetuar *clean up* de matrizes ricas em materiais gordurosos, que eram separados do solvente extrator por precipitação em baixa temperatura. No entanto, essa técnica recomendava um abaixamento de temperatura extremo (-70° C) e isso impediu o amplo uso da mesma. (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007) Levando como base esse estudo, uma técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) foi aprimorada no Laboratório de Química Analítica da Universidade Federal de Viçosa (LAQUA) para análise de piretróides em água (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007) e leite, (GOULART et al., 2008) com o objetivo de

diminuir os impactos ambientais causados pelo uso de solventes orgânicos. Esse método consiste em formar uma fase única, em temperatura ambiente, ao colocar uma amostra aquosa em contato com um solvente extrator que seja menos denso que a água e que tenha ponto de fusão abaixo de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sistema é agitado e levado ao freezer, por um determinado período, para separação das fases, isto é, a fase aquosa é congelada e separada da fase orgânica, que é analisada por cromatografia. (GOULART et al., 2008) Os resultados deste estudo foram bastante promissores para o campo da química analítica, uma vez que essa técnica apresenta algumas vantagens em relação às demais técnicas de extração, tais como, o número de etapas significativamente reduzido, além de reduzir o consumo de solventes orgânicos. (GOULART et al., 2008) O método LLE/LTP e a análise subsequente tem permitido ser usado em análises forenses (MAGALHÃES et al., 2013; PAULA et al., 2018) e em amostras ambientais. (GOULART et al., 2008)

Considerando os estudos em amostras líquidas usando a LLE/LTP, Paula e colaboradores (2018) analisaram bebidas, entre elas a cerveja, para identificar e quantificar benzodiazepínicos, por espectrometria de massa por *spray* em papel (*paper spray mass spectrometry* - PS-MS) como método de análise, mostrando que a técnica teve potencial para extração dos compostos estudados.

O método é prático e de fácil execução, apesar do tempo de congelamento da fase aquosa ser longo em alguns casos.

4. Hifenação de técnicas com a DLLME

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME), que é uma técnica da LLE miniaturizada, (JAIN; SINGH, 2016) geralmente tem sido escolhida preferível para a análise de amostras com uma matrizes simples, como a água. (PANG et al., 2017; REZAEI; ASSADI; HOSSEINI, 2006) No entanto, as aplicações da DLLME tem se concentrado no últimos anos em estudos com matrizes mais complexas, como alimentos (ALHARTHI; AL-SAIDI, 2022; PENG et al., 2017) bebidas, (CUSTODIO-MENDOZA et al., 2022; RODRÍGUEZ-CÁCERES et al., 2017) amostras farmacêuticas e biológicas. (ALCANTARA et al., 2020; JAIN; SINGH, 2016) A complexidade dessas amostras, bem como sua capacidade de degradação, tem dificultado a aplicação da DLLME, além da utilização de solventes clorados, (BERIJANI; ASSADI; ANBIA, 2006; REZAEI; ASSADI; HOSSEINI, 2006) que são extremamente tóxicos. (ASENSIO-

RAMOS et al., 2011) Para minimizar essas desvantagens tem sido feita uma etapa anterior de extração ou limpeza. (RODRÍGUEZ-CÁCERES et al., 2017)

A DLLME tem sido hifenada a diferentes técnicas de extração como extração com solvente orgânico por agitação, (TSAI et al., 2010) extração assistida por ultrassom, (JOFRÉ et al., 2010; PIERGIOVANNI et al., 2018) extração em fase sólida, (YAO et al., 2019) extração líquido-líquido, (TABARAKI; HEIDARIZADI, 2019) extração assistida por micro-ondas (ZHOU, Y. et al., 2011) e extração com gota orgânica flutuante solidificada. (TSAI et al., 2010)

Levando em consideração que a DLLME têm sido utilizada com outras técnicas de extração para fazer a pré-concentração (JAIN; SINGH, 2016) e que o único inconveniente da LLE/LTP é não permitir a pré-concentração da amostra, (VIEIRA; NEVES; QUEIROZ, 2007) a hifenação das duas técnicas se mostra propícia e vantajosa.

Análise por cromatográfica e seus diferentes detectores

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica com excelente poder de resolução, possibilitando a análise de várias substâncias em uma mesma amostra. (PERES, 2002) Esta técnica é muito utilizada para determinação de compostos voláteis, em diferentes matrizes, incluindo cerveja. (PINHO; FERREIRA; SANTOS, 2006; STEFANUTO et al., 2018)

A escolha da coluna cromatográfica para separação dos compostos em uma amostra é muito importante, principalmente quando vários compostos são avaliados simultaneamente. As colunas que têm o polietilenoglicol como fase estacionária, por exemplo, se caracterizam por ser uma coluna polar, sendo muito utilizada na análise de ácidos graxos, aromas e álcoois em diferentes matrizes. Colunas contendo 5% de difenil e 95% de dimetilpolisiloxano como fase estacionária, são colunas apolares, sendo muito usadas também para análise de compostos voláteis como álcoois, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, etc. (RESTEK, 2022)

Outro fator importante é a seleção do detector. Essa seleção, no entanto, não deve ser apenas influenciada pelo fator de custo instrumental ou pela disponibilidade para identificação dos compostos, mas também considerando o melhor método de análise que possa promover medições confiáveis e precisas e que não traga questionamentos quanto aos resultados. (APARICIO-RUIZ et al., 2018)

Aparicio-Ruiz e colaboradores (2018) fizeram um estudo comparando a determinação de compostos voláteis em azeites extra virgem empregando um cromatógrafo a gás com detector por ionização em chama (GC/FID) e um acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS). Os parâmetros analíticos avaliados mostraram que ambas as abordagens analíticas poderiam ser aplicadas, uma vez que os dois detectores apresentam vantagens e desvantagens, ou seja, dependendo da sensibilidade e seletividade requeridas.

Tanto a cromatografia gasosa com detector FID quanto a acoplada ao MS têm sido utilizadas para avaliar os compostos voláteis de cerveja. (VIEJO et al., 2019) Portanto, verificar qual a melhor opção a ser utilizada levando em consideração os compostos de interesse é de extrema importância para estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA, G. K. S. et al. A fast DLLME-LC-MS / MS method for risperidone and its metabolite 9-hydroxyrisperidone determination in plasma samples for therapeutic drug monitoring of patients. **Microchemical Journal**, v. 156, n. February, p. 104894, 2020.
- ALHARTHI, S. S.; AL-SAIDI, H. M. Designing a simple semi-automated system for preconcentration and determination of nickel in some food samples using dispersive liquid-liquid microextraction based upon orange peel oil as extraction solvent. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 104094, 2022.
- ALMEIDA, C.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. A novel dispersive liquid e liquid microextraction (DLLME) gas chromatography- mass spectrometry (GC e MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 380–388, 2012.
- APARICIO-RUIZ, R. et al. Comparison of two analytical methods validated for the determination of volatile compounds in virgin olive oil : GC-FID vs GC-MS. **Talanta**, v. 187, n. May, p. 133–141, 2018.
- ARRIETA-GARAY, Y. et al. Effects of Distillation System and Yeast Strain on the Aroma Profile of Albarino (Vitis vinifera L.) Grape Pomace Spirits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 10552–10560, 2014.
- ASENSIO-RAMOS, M. et al. Liquid phase microextraction applications in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 7415–7437, 2011.
- ASHRAF, A.; RAMAMURTHY, R.; RENE, E. R. Wastewater treatment and resource recovery technologies in the brewery industry: Current trends and emerging practices. **Sustainable Energy Technologies and Assessments**, v. 47, n. June, p. 101432, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.seta.2021.101432>>.
- BEER ART. **O mapa da cerveja no Brasil**. Disponível em: <<https://revistabeerart.com/news/cervejarias-brasil#:~:text=O Brasil chegou a um,da primeira fábrica no Acre.>>. Acesso em: 8 jul. 2022.
- BERIJANI, S.; ASSADI, Y.; ANBIA, M. Dispersive liquid – liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection Very simple , rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, p. 1–9, 2006.
- CASTRO, L. F.; ROSS, C. F.; VIXIE, K. R. Optimization of a Solid Phase Dynamic Extraction (SPDE) Method for Beer Volatile Profiling. **Food Analytical Methods**, v. 8, n. 8, p. 2115–2124, 2015.
- CERVBRASIL. **Dados do setor – Cerv Brasil – Associação Brasileira da Indústria da Cerveja**. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/>. Acesso em: 8 jul. 2022.

- CHARALAMBOUS, G. **Off-Flavors in Foods and Beverages**. Amsterdã: Developments in Food Science, 1992.
- CHARRY-PARRA, G.; DEJESUS-ECHEVARRIA, M.; PEREZ, F. J. Beer Volatile Analysis : Optimization of HS / SPME Coupled to GC / MS / FID. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. C205–C211, 2011.
- CORTACERO-RAMÍREZ, S. et al. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 440–455, 2003.
- CUSTODIO-MENDOZA, J. A. et al. GC – MS determination of malondialdehyde , acrolein , and 4-hydroxy-2-nonenal by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction in beverages. **Food Chemistry**, v. 384, n. July 2021, 2022.
- DEVOLLI, A. et al. Evaluation of brewery waste and its reduction methods. **Albanian Journal of Agricultural Sciences**, n. 506–513, 2018.
- DIEGUEZ, S. C.; PENA, M. L. G. D. LA; GOMEZ, E. F. Volatile Composition and Sensory Characters of Commercial Galician Orujo Spirits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 63, n. 17, p. 6759–6765, 2005.
- EBRAHIMZADEH, H. et al. Homogeneous liquid – liquid extraction of trace amounts of mononitrotoluenes from waste water samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 594, p. 93–100, 2007.
- EDELBRAU. **Sustentabilidade _ Cervejaria Edelbrau**. Disponível em: <<https://edelbrau.wordpress.com/tag/sustentabilidade/>>. Acesso em: 10 jul. 2022.
- FARAJZADEH, M. A. et al. Original Paper Dispersive liquid – liquid microextraction using extraction solvent lighter than water. p. 3191–3200, 2009.
- FARIÑA, L. et al. Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid – liquid microextraction and gas chromatography – mass spectrometry detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1157, p. 46–50, 2007.
- FERREIRA, T. P. Processo de Produção de Cerveja. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 6, p. 61, 2009.
- FILLAUDEAU, L.; BLANPAIN-AVET, P.; DAUFIN, G. Water, wastewater and waste management in brewing industries. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, n. 5, p. 463–471, 2006.
- FREITAS, S. De et al. Development of a solid-liquid extraction method with low-temperature partitioning for the determination of insecticides in ozonized maize grain. **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 238–243, 2014.
- GALVÃO, M. P. A Química da Cerveja. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, v. 37, p. 8, 1997.

GIANNETTI, V. et al. Flavour component analysis by HS-SPME/GC–MS and chemometric modeling to characterize Pilsner-style Lager craft beers. **Microchemical Journal**, v. 149, n. March, p. 103991, 2019.

GOULART, S. M. et al. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–1323, 2008.

HELENO, F. F. et al. Determination of fungicides in bell pepper using solid-liquid extraction with low temperature partitioning. **Microchemical Journal**, v. 148, n. March, p. 79–84, 2019.

HO, C. J. et al. Isolation of aromatic yeasts (non- *Saccharomyces cerevisiae*) from Korean traditional nuruks and identification of fermentation characteristics. v. 4, n. 5, p. 136–140, 2013.

HORNSEY, I. S.; BREWERY, N. **Beer : History and Types**. 1. ed. Nethergate Brewery, Pentlow, UK: Elsevier Ltd., 2016.

HUMIA, B. V. et al. Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties : A Review. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1568, 2019.

JAIN, R.; SINGH, R. Applications of dispersive liquid – liquid micro-extraction in forensic toxicology. **Trends in Analytical Chemistry journal**, v. 75, p. 227–237, 2016.

JOFRÉ, V. P. et al. Optimization of ultrasound assisted-emulsification-dispersive liquid – liquid microextraction by experimental design methodologies for the determination of sulfur compounds in wines by gas chromatography – mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 683, p. 126–135, 2010.

KISHIMOTO, T. et al. Simulation of Pilsner-type beer aroma using 76 odor-active compounds. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 126, n. 3, p. 330–338, 2018.

LANÇAS, F. M. Review The Role of the Separation Sciences in the 21 th Century. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 2, p. 183–197, 2003.

LIU, J. et al. Triton X-114 based cloud point extraction : a thermoreversible approach for separation / concentration and dispersion of nanomaterials in the aqueous phase. **Chem. Commun.**, v. 28, n. 12, p. 1514–1516, 2009.

LIU, S.-Q. Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour. **Brew. Microbiol.** [S.l.]: Elsevier, 2015. p. 357–374. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00017-4>>.

LÓPEZ-MAYAN, J. et al. Cloud point extraction and ICP-MS for titanium speciation in water samples. **Microchemical Journal**, v. 152, n. October 2019, p. 104264, 2020.

LÓPEZ-VÁZQUEZ, C. et al. Fast determination of principal volatile compounds in

distilled spirits. **Food Control**, v. 21, p. 1436–1441, 2010.

MAGALHÃES, E. J. et al. Determination of cocaine in postmortem human liver exposed to overdose . Application of an innovative and efficient extraction / clean up procedure and gas chromatography – mass spectrometry analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1309, p. 15–21, 2013.

MANYI-LOH, C. E.; NDIP, R. N.; CLARKE, A. M. Volatile Compounds in Honey : A Review on Their Involvement in Aroma, Botanical Origin Determination and Potential Biomedical Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 9514–9532, 2011.

MARCUSSO, E. F.; MÜLLER, C. V. **ANUÁRIO DA CERVEJA NO Bras. 2018 Crescimento e Inovação**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/anuario-da-cerveja-no-brasil-2018>>. Acesso em: 30 out. 2022.

MARTINEZ-GOMEZ, A.; CABALLERO, I.; BLANCO, C. A. Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in. **Biomolecules**, v. 10, p. 400, 2020.

MESTRE CERVEJEIRO. **Heineken Mega fábricas**. . Amsterdã: Heineken. Disponível em: <<https://vimeo.com/25261246>>. , 2011

MEUSSDOERFFER, F. G. A Comprehensive History of Beer Brewing. **Handb. Brew. Process. Technol. Mark**. 1ª edição ed. Weinheim: WILEY-VCH, 2009. p. 1–42.

MORADO, R. **Larousse da Cerveja**. 1ª edição ed. São Paulo: Alaúde Editorial Ltda, 2017.

MÜLLER, A. **Cerveja!** Editora da ed. Canoas, RS: Editora da ULBRA, 2012.

NACHEL, M.; ETTLINGER, S. **Cerveja para leigos**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Alta Books, 2019.

OLANIRAN, A. O.; HIRALAL, L.; MOKOENA, M. P. Flavour-active volatile compounds in beer : production , regulation and control. **Journal Institute Brewing**, n. October 2016, p. 13–23, 2017.

OSORIO-PAZ, I.; BRUNAUER, R.; ALAVEZ, S. Beer and its non-alcoholic compounds in health and disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–14, 2019.

OUYANG, X. et al. Aromatic compounds and organoleptic features of fermented wolfberry wine : Effects of maceration time Aromatic compounds and organoleptic features of fermented wolfberry wine : Effects of maceration time. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 10, p. 2234–2248, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1233435>>.

PANG, L. et al. Trace determination of organophosphate esters in white wine, red wine, and beer samples using dispersive liquid-liquid microextraction combined with

ultra-high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 229, p. 445–451, 2017.

PAULA, C. de et al. Recognizing drug - facilitated crimes : Detection and quantification of benzodiazepines in beverages using fast liquid – liquid extraction with low temperature partitioning and paper spray mass spectrometry. **Drug Test Anal.**, v. 10, n. September 2017, p. 1348–1357, 2018.

PAWLISZYN, J. Solid-Phase Microextraction in Perspective. **Handbook of Solid Phase Microextraction**, p. 1–6, 2012.

PENG, B. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with digital image colorimetric analysis for detection of total iron in water and food samples. **Food Chemistry**, v. 230, p. 667–672, 2017.

PEREIRA, A. F. **Produção de Cerveja Artesanal**. Viçosa: SIA- Universidade Federal de Viçosa, 2021.

PEREIRA, A. R. F. B. **Produção de bebidas espirituosas tendo como base a destilação artesanal**. 2018. 64 f. Taylor & Francis, 2018.

PERES, T. B. Noções básicas de cromatografia. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 227–229, 2002.

PIAZZON, A.; FORTE, M.; NARDINI, M. Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 10677–10683, 2010.

PIERGIOVANNI, M. et al. Determination of benzodiazepines in beverages using green extraction methods and capillary HPLC-UV detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 154, p. 492–500, 2018.

PIMENTA, G. G. et al. DLLME-GC/ECD Method for the Residual Analysis of Parathion-Methyl and its Application in the Study of the UV-Photodegradation Process. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 28, n. 11, p. 2045–2053, 2017.

PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; SANTOS, H. M. L. M. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1121, p. 145–153, 2006.

POELMANS, E.; SWINNEN, J. A Brief Economic History of Beer A Brief Economic History of Beer. In: OXFORD, U. de (Org.). . **Econ. Beer**. Oxford, Reino Unido: Universidade de Oxford, 2012. p. 3–28.

POELMANS, E.; SWINNEN, J. F. M. **A Historical Review of the Beer Economy From Monasteries to Multinationals (and Back): A Historical Review of the Beer Economy**. [S.l: s.n.], 2009.

QUEIROZ, M. E. C. Microextração em fase sólida para análise de fármacos em

fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica Microextração**, v. 1, n. 3, p. 11–19, 2009.

RESTEK. **Colunas GC**. Disponível em: <<https://www.restek.com/row/products/columns/gc-columns/>>. Acesso em: 13 jul. 2022.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINI, M. M. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid – liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, p. 1–9, 2006.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid – liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342–2357, 2010.

RODRÍGUEZ-CÁCERES, M. I. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction for a rapid determination of glyoxal in alcoholic beverages. **Talanta**, v. 168, n. March, p. 100–104, 2017.

ROSENTRATER, K. A. Malting, brewing, fermentation, and distilling. In: WOODHEAD PUBLISHING (Org.). **Kent's Technol. Cereal**. Amsterdã: Elsevier, 2018. p. 729–784.

SARAJI, M. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction of chloroacetic acids from water samples using a syringe-like glass extraction vessel. **Microchemical Journal**, v. 146, n. February, p. 914–921, 2019.

SEBRAE. **Cerveja sustentável_ conheça boas práticas para cervejarias**. Disponível em: <<http://inovacaosebraeminas.com.br/ceveja-sustentavel-conheca-boas-praticas-para-ervejarias/>>. Acesso em: 8 jul. 2022.

SILVA, T. L. R. et al. Microextraction technique associated with gas chromatography – mass spectrometry for determining pesticide residues in urine. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2022.

STEFANUTO, P. et al. Advanced method optimization for volatile aroma profiling of beer using two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1507, p. 45–52, 2018.

TABARAKI, R.; HEIDARIZADI, E. Spectrophotometric determination of phenol and chlorophenols by salting out assisted liquid-liquid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 215, p. 405–409, 2019.

TSAI, W. et al. Determination of sulfonamides in swine muscle after salting-out assisted liquid extraction with acetonitrile coupled with back-extraction by a water / acetonitrile / dichloromethane ternary component system prior to high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 250–255, 2010.

TUZEN, M.; PEKINER, O. Z. Ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid – liquid

microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometric for selenium speciation in foods and beverages. **Food Chemistry**, v. 188, p. 619–624, 2015.

VANDERHAEGEN, B. et al. Evolution of Chemical and Sensory Properties during Aging of Top-Fermented Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 23, p. 6782–6790, 2003.

VIANA, F. et al. Rational selection of non- *Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. **Food Microbiology journal**, v. 25, p. 778–785, 2008.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. de. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535–540, 2007.

VIEJO, C. G. et al. Chemical characterization of aromas in beer and their effect on consumers liking. **Food Chemistry**, v. 293, n. April, p. 479–485, 2019.

WANNENMACHER, J.; GASTL, M.; BECKER, T. Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 4, p. 953–988, 2018.

WORLD POPULATION REVIEW. **Beer Consumption by Country 2022**. Disponível em: <<https://worldpopulationreview.com/country-rankings/beer-consumption-by-country>>. Acesso em: 8 jul. 2022.

XU, J.; OUYANG, G. Extraction : Solid-Phase Microextraction. In: **ENCYCLOPEDIA OF ANALYTICAL SCIENCE (Org.)**. . **Encycl. Anal. Sci.** 3. ed. Guangzhou, China: Elsevier Inc., 2019. p. 100–108.

YAO, L. et al. Combination of dispersive solid phase extraction with dispersive liquid – liquid microextraction for the sequential speciation and preconcentration of Cr (III) and Cr (VI) in water samples prior to graph. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 72, p. 189–195, 2019.

ZANELLA, D. et al. Comparison of headspace solid-phase microextraction high capacity fiber coatings based on dual mass spectrometric and broadband vacuum ultraviolet absorption detection for untargeted analysis of beer volatiles using gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 1141, p. 91–99, 2021.

ZHOU, Q.; PANG, L.; XIAO, J. Trace determination of dichlorodiphenyltrichloroethane and its main metabolites in environmental water samples with dispersive liquid – liquid microextraction in combination with high performance liquid chromatography and ultraviolet detector. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 6680–6684, 2009.

ZHOU, Y. et al. Dispersive liquid – liquid microextraction based on the solidification of

a floating organic droplet for simultaneous analysis of diethofencarb and pyrimethanil in apple pulp and peel. **Anal Bioanal Chem**, v. 399, p. 1901–1906, 2011.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar os principais compostos presentes em cervejas pilsen utilizando diferentes métodos de extração e análise, destilar uma cerveja pilsen e caracterizar a composição química desse destilado, assim como otimizar e validar um método de triagem simples para a análise de dietilenoglicol.

Objetivos específicos:

- Destilar uma cerveja pilsen para obter uma nova bebida;
- Otimizar a técnica como a microextração em fase sólida (SPME) para análise de compostos voláteis na cerveja pilsen e no destilado dessa cerveja;
- Otimizar as técnicas de microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME); de extração líquido-líquido com partição à baixa temperatura (LLE/LTP) e da LLE/LTP hifenada com a DLLME para determinação de compostos voláteis, semi-voláteis e não voláteis na cerveja por cromatografia gasosa;
- Caracterizar os compostos voláteis, semi-voláteis e não voláteis presentes da cerveja;
- Otimizar e validar um método simples, eficaz e de baixo custo para a extração de dietilenoglicol em amostras de cerveja.

CAPÍTULO 1. CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE CERVEJA PILSEN E DESTILADO DE CERVEJA POR CROMATOGRAFIA GASOSA

1. INTRODUÇÃO

As empresas estão cada vez mais atentas não só à qualidade do produto, mas também a adoção de práticas sustentáveis em sua produção, visando o bem do planeta ao utilizar o aproveitamento de resíduos e conseqüentemente, causar uma redução de custos. (RUGANI, 2019) Utilizar resíduos de cerveja e de vinho para a produção de outras bebidas tem sido uma forma de reutilizá-los. (LÓPEZ-VÁZQUEZ et al., 2010) Exemplo disso é o orujo que é uma bebida alcoólica produzida da destilação de bagaço de uva e Hoppy Gin ou London dry/gin, que é um tipo de destilado produzido a partir de cerveja. (PEREIRA, 2018) Para fazer esse tipo de aproveitamento, um dos processos mais importante na fabricação dessa bebida é a destilação. (SERAFIM et al., 2012)

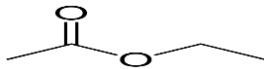

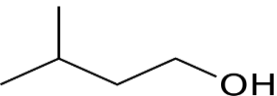
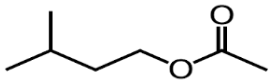
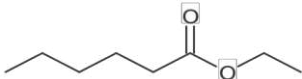

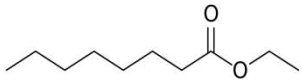
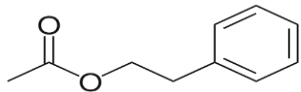
A produção de destilados em larga escala se caracteriza pela utilização de colunas de aço inox em processos de destilação contínuos. Já na produção em pequena escala, a destilação é realizada em alambiques de cobre, onde ocorre a separação da bebida em três diferentes frações através do processo denominado “corte”. (SOUZA et al., 2009) A primeira fração a ser recolhida é chamada de “cabeça”, cuja separação remove o excesso de compostos mais voláteis e/ou mais solúveis em etanol. A segunda fração é o “coração”, parte nobre do destilado e utilizada para fins comerciais. A última fração, a “cauda”, contém o excesso de compostos menos voláteis que o etanol e mais solúveis em água do que em etanol (SERAFIM et al., 2012) .

A composição dos perfis voláteis das frações de um destilado pode ser considerada uma estratégia que permite a autenticação do mesmo, uma vez que os componentes variam de acordo com a matéria-prima (WEISS et al., 2022) e a tecnologia empregada para sua fabricação. (SERAFIM et al., 2012) Para realizar a autenticação das bebidas são necessárias análises sensoriais e/ou físico-químicas. (SERAFIM; SEIXAS; GALINARO, 2013) Para as análises físico-químicas, como as cromatográficas, é necessário um pré-tratamento para isolar os compostos de interesse, pois bebidas, como a cerveja e o destilado, são amostras muito complexas. (ZANELLA et al., 2021)

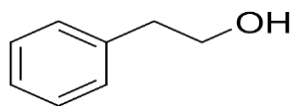
Nos últimos anos, a microextração em fase sólida no *headspace* (HS-SPME) em combinação com a cromatografia gasosa tem sido implementada como principal método para a determinação da composição padrão de voláteis em alimentos, incluindo cerveja (ALVES et al., 2020; PINHO; FERREIRA; SANTOS, 2006; ZANELLA et al., 2021) e destilados (GIANNETTI et al., 2019; LÓPEZ-VÁZQUEZ et al., 2012). Um fator importante a ser verificado é a seleção do detector que possa promover medições confiáveis e precisas, sendo os principais o GC/FID e o GC-MS (APARICIO-RUIZ et al., 2018).

Os principais compostos identificados por cromatografia gasosa em amostras de cerveja e destilados estão apresentados na Tabela 1.

1 **Tabela 1.** Compostos voláteis identificados em amostras de cerveja e suas respectivas fórmulas moléculas, classe química, odor
 2 característico e temperatura de ebulição
 3

Compostos	Fórmula molecular	Classe Química	Odor Característico*	Ponto de ebulição (°C)
Acetato de Etila		Éster	Abacaxi,	77,1
Etanol		Álcool	-	78,37
Álcool isobutilico		Álcool	Maltado	82,6
Álcool isoamilico		Álcool	Álcool Fúsil	131
Hexanoato de etila		Éster	Doce, fruta	168
1-pentanol		Álcool	-	138
Octanoato de etila		Éster	Frutado	208
Acetato 2- feniletil		Composto aromático	Floral, hortelã	238-239

2- fenietanol



Composto
aromático

Floral, fusel

225

1

2

* fonte: (JELEŃ; MAJCHER; SZWENGIEL, 2019)

Os *off-flavours* ou seja, aqueles compostos que dão gosto desagradável, são os principais e mais sérios problemas na indústria de cerveja, uma vez que os consumidores julgam o sabor do produto e quando essa cerveja não está dentro dos padrões estabelecidos ela é descartada. Os álcoois superiores como o 2-feniletanol, produz um sabor doce ou rosa na cerveja, mas um excesso desses compostos pode dar um cheiro desagradável, bem como dores de cabeça ao beber. Os ésteres podem enriquecer o aroma da cerveja, mas sua forte fragrância pode dominar o sabor da cerveja. (WU et al., 2021) Esse fator causa prejuízo de milhões para a empresa, além de mais resíduos para o meio ambiente. Em função disso, dar uma destinação para essa cerveja que seria descartada é de suma importância tanto para o meio ambiente, quanto para as políticas de sustentabilidade das empresas, devido à redução de prejuízos causados por erros no processo de fabricação.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivos caracterizar os principais compostos presentes em cerveja, assim como destilar uma determinada cerveja considerada fora do padrão e caracterizar a composição química desse destilado ao longo do processo de destilação, visando acompanhar a composição química dessas frações.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes e soluções

Foram utilizados como padrão alguns compostos comumente identificados em bebidas como etanol 99,3% (Química Moderna, Brasil), acetato de etila 99,5%, acetato 2- feniletila 98%, hexanoato de etila 98%, octanoato de etila 99%, , álcool isobutílico 99,05%, álcool isoamílico 98,5%, Álcool fenílico 98% e 1-pentanol 99% (Tabela 1), adquiridos da VETEC, Brasil. Foram utilizados nesse trabalho acetonitrila, 99,5% - grau HPLC (Sigma-Aldrich, USA), tolueno 99,5% (VETEC- Sigma-Aldrich, USA) e cloreto de sódio, 99,0% m/m (Êxodo Científica, Brasil). Solução-estoque contendo acetato de etila, acetato de 2-feniletila, álcool isobutílico, álcool isoamílico e 1-pentanol (concentrações de 4 mg L⁻¹) hexanoato de etila e octanoato de etila (48 µg L⁻¹) álcool fenílico (100 µg L⁻¹) e etanol (160 mg L⁻¹) foi preparada em um único balão com água ultrapura (18,2 mΩ cm⁻¹), obtida pelo sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Massachusetts, Estados Unidos da América).

Foram preparadas soluções de 1 g L⁻¹ de todos os padrões separadamente em água ultrapura para determinação do tempo de retenção de cada composto. Essas soluções foram utilizadas para testes preliminares e otimização do método HS-SPME. Todas as soluções foram armazenadas em geladeira (Brastemp) à temperatura entre (3 ± 1 ° C).

2.2. Instrumentos e aparelhos

A identificação inicial e preliminar dos compostos foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu, modelo GCMS-QP2020, Japão) equipado com um amostrador manual (Shimadzu, modelo, AOC-20i, Japão). As identificações dos compostos de estudo foram realizadas em um cromatógrafo a gás (GC - Shimadzu, modelo GC 2014 Plus, Japão) equipado com um amostrador manual (Shimadzu, modelo, AOC-20i Plus, Japão) e um detector de ionização em chama (FID) de acordo com o tempo de retenção de cada composto.

Outros equipamentos usados foram: balança analítica (Modelo AX200, Shimadzu, Japão), geladeira (Brastemp, São Paulo, Brazil), banho ultratermostático SL 152 (Solab) acoplada a uma câmara de madeira de 60 cm x 55 cm x 40 cm (largura x altura x profundidade), agitador magnético, um Alambique de 20 litros de cobre e aço inoxidável (Santa Eugênia) e um refratômetro (Kasvi).

2.3. Amostras

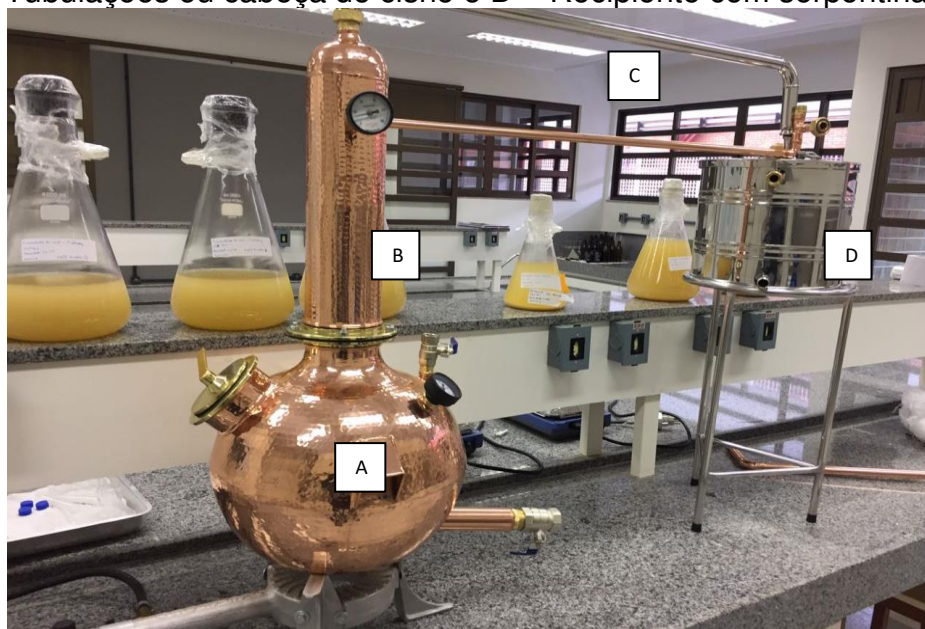
Amostras de cerveja comerciais, artesanais e caseiras foram adquiridas no comércio ou de um *Homebrewing* (produtor caseiro de cerveja) de Viçosa.

Uma pequena parte das amostras de cerveja foram guardadas para a realização de análises para estudo de comparação com o destilado e a outra parte das amostras foi destilada.

As amostras de cerveja foram acondicionadas em geladeira (3 ± 1 °C) até o momento do estudo. Já as amostras de destilado foram acondicionadas em temperatura ambiente.

O destilado de cerveja foi produzido no Laboratório de Bebidas e Processos Biotecnológicos do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. Para a produção do destilado, foi empregado o alambique, representado na Figura 1. Foram preparados dois tipos de destilado. O primeiro utilizou-se cerca de 18 litros de cerveja com um pool de diferentes estilos artesanais e industriais de caráter preliminar. Também foi utilizado cerca de 18 litros de cervejas de mesmo estilo e da mesma marca para critérios de comparação desde a cerveja até a produção do destilado (cabeça, coração e cauda). Por questões de praticidade, inicialmente a amostra de cerveja foi aquecida em uma panela de 20 L até que se atingisse uma temperatura de 60 °C. Após aquecimento a cerveja foi transferida para o alambique (Figura 1A) e submetida à destilação. A temperatura foi mantida em aproximadamente 100 °C e as frações, denominadas, cabeça, coração e cauda, foram coletadas separadamente. A separação das frações foi realizada, com o auxílio de um refratômetro, de acordo com o teor alcoólico das amostras recolhidas. A cabeça correspondeu a 1% do total da cerveja; o coração foi separado quando a bebida atingiu cerca de 30% de teor alcoólico e a cauda, corresponde ao líquido presente no processo final da destilação, equivalente a aproximadamente 1% do volume do líquido total da cerveja.

Figura 1. Alambique de cobre (parte A e B) e aço inoxidável (parte C e D) utilizado na produção do destilado: A – Corpo do Alambique; B – Capitel ou capacete C - Tubulações ou cabeça de cisne e D – Recipiente com serpentina.



2.4. Microextração em fase sólida (SPME)

O método baseado na HS/SPME-GC-MS desenvolvido por Pinho e colaboradores (2006) foi modificado e empregado para a extração de compostos voláteis de cervejas e de um destilado de cerveja.

A fibra utilizada para a extração dos compostos voláteis da cerveja foi a DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano) (Supelco) 50/30 μm . Nesse estudo 5,00 g de amostra de cerveja foram colocados em um frasco de headspace de 15,00 mL contendo cerca de 2,00 g de NaCl. Os frascos de amostra foram mantidos em equilíbrio por 30 min a 20 °C em uma câmara acoplada a um banho ultratermostático SL 152 (Solab) (Figura 2). Após esse tempo a fibra foi exposta ao headspace por mais 30 min. Posteriormente, a fibra foi recolhida e o dispositivo SPME removido do frasco e inserido no injetor do sistema GC-MS para dessorção térmica dos analitos. Durante o processo de injeção, a fibra foi mantida exposta por 2 min. Os experimentos foram realizados em duplicata. O mesmo procedimento foi realizado com o destilado.

Figura 2. Câmara utilizada durante os procedimentos de extração de voláteis por HS-SPME: (A) Banho ultratermostático; (B) Câmara; (C) Agitador magnético.



2.5. Análise de soluções padrão de compostos presentes na cerveja e no destilado de cerveja

Após identificação dos principais compostos presentes na cerveja e no destilado, procedimentos análogos foram realizados com os padrões analíticos. O procedimento de extração foi empregado em um frasco de headspace (15 mL), contendo cerca de 2,00 g de NaCl e 5,00g de água fortificada com 100 μ L da solução estoque (preparada no item 2.1) do mix de padrões.

2.5.1. Estudo do efeito *Salting out*

Avaliou se haveria a necessidade ou não do uso de sal nesse estudo e assim avaliar o efeito *salting out* da extração. Para isso, uma amostra de cerveja foi contaminada com a solução padrão usando o método de extração HS-SPME.

Nesse estudo, colocou-se em um frasco de headspace (15 mL), contendo cerca de 2,00 g de NaCl e outros frasco sem sal. Colocou-se mais 5,00 g de cerveja e fortificou-

se mais 100 μL da solução estoque (preparada no item 2.1). Esses frascos foram adicionados 5,00 g de cerveja e 100 μL da solução estoque (preparada no item 2.1) contendo os padrões analíticos. Os frascos de amostra foram mantidos em equilíbrio por 30 min a 20 °C em uma câmara acoplada a um banho ultratermostático SL 152 (Solab) (Figura 1). Após esse tempo a fibra foi exposta ao headspace por mais 30 min. Posteriormente, a fibra foi recolhida e o dispositivo SPME foi removido do frasco e inserido no injetor do sistema GC-MS para dessorção térmica dos analitos. Durante o processo de injeção, a fibra foi mantida exposta por 2 min. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.6. Condições Cromatográficas

2.6.1. Condições cromatográficas da análise qualitativa de compostos voláteis extraídos por HS-SPME usando o GC-MS

A identificação dos compostos presentes nas amostras de cervejas e nas amostras de destilado, foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa. O Hélio (99.999%, White Martins, Brasil) foi usado como gás de arraste. A temperatura do injetor e do detector foram mantidas a 250 °C. Testes preliminares foram realizados e um volume de 1 μL foi injetado no modo splitless com um tempo de amostragem de 60 s. A separação foi realizada em uma coluna capilar NA-Wax (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm de espessura do filme).

As condições cromatográficas foram otimizadas e foi utilizado o modo *select ion monitoring* (SIM), mas antes de definir as condições para esse modo, foram feitas análises no modo (Scan), com a finalidade de confirmar a ordem de eluição dos analitos do mix de padrões, otimizar a programação de temperatura e obter os tempos de retenção (t_R) e os espectros de massas de todos os compostos voláteis de interesse. A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: temperatura inicial de 32 °C (mantida por 5 min) e depois elevando a uma taxa de 10 °C min^{-1} até atingir 70 °C (mantida por 0,5 min). Posteriormente, a temperatura foi elevada novamente na taxa de 15 °C min^{-1} até atingir 180 °C, sendo esta mantida por 2 min. O tempo de análise foi de 21,63 min. As temperaturas do injetor, da interface do detector e da fonte de ionização foram mantidas em 250 °C.

Portanto, o espectrômetro de massas (MS) foi operado em modo de ionização por impacto de elétrons 70 eV, usando Hélio (99,999% de pureza; Air Product, Brasil) como gás de arraste. As temperaturas da interface do detector e da fonte de ionização foram fixadas em 250 °C e o modo de injeção foi splitless. A análise foi realizada no modo *Scan* ou TIC (*total ion chromatogram* - cromatograma de íons totais) obtendo os tempos de retenção (t_R) e os possíveis compostos de acordo com a Mass Spectral library (NIST 14).

2.6.2. Condições cromatográficas da análise dos compostos voláteis extraídos por HS-SPME utilizando o GC-FID.

Para análise dos compostos de interesse foi utilizado um GC-FID equipado com uma coluna capilar NA-WAX (polietilenoglicol) 30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme. O método de extração utilizado foi a SPME e as condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas na otimização do GC-MS. As temperaturas do injetor e detector foram mantidas em 250 e 250 °C, respectivamente. Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste ($1,2 \text{ mL min}^{-1}$), gás hidrogênio e ar sintético foram utilizados para manter a chama do FID. Todos os gases utilizados nessas análises foram 99,999% de pureza fornecido pela Air Product, Brasil.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Produção do Destilado

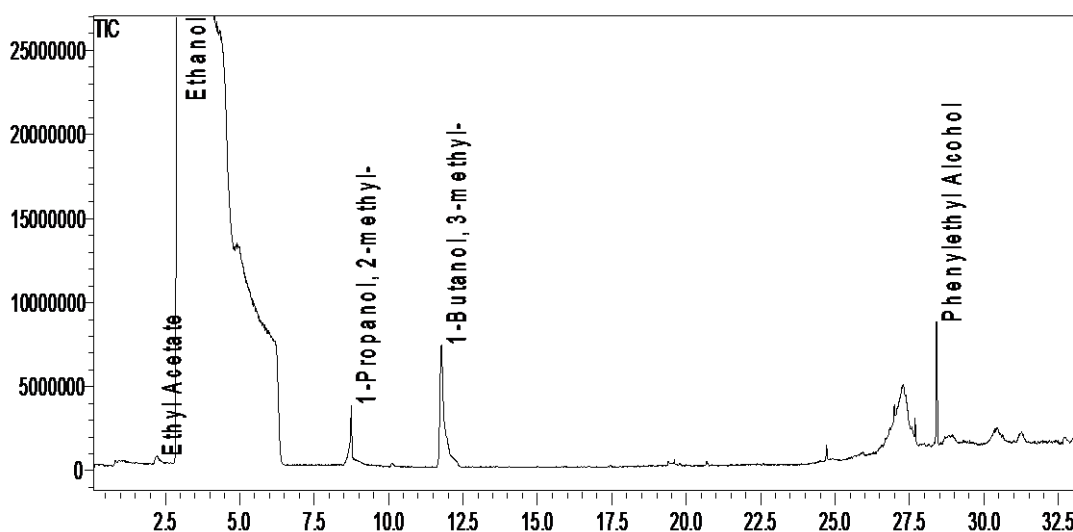
Inicialmente foi produzido um destilado a partir de diferentes cervejas industriais e artesanais para caráter de estudo e testes cromatográficos preliminares. Também foi produzido um outro destilado utilizando uma cerveja comercial da mesma marca a qual foi separada nas frações cabeça, coração e cauda. O teor alcoólico médio das frações cabeça, coração e cauda foram de 49,9 °GL, 31,9 °GL e 19,4 °GL respectivamente.

O preparo do destilado foi uma etapa primordial para o estudo, uma vez que depois dessa etapa foram definidos os compostos que seriam analisados, bem como a metodologia adotada.

3.2. Avaliação qualitativa preliminar do perfil volátil dos compostos presentes na cerveja e no destilado de cerveja usando o HS-SPME-GC-MS

A HS-SPME-GC-MS foi utilizada para extrair os compostos voláteis da cerveja e do destilado da cerveja. Inicialmente os compostos de uma cerveja comercial e um destilado produzido de variadas cervejas foi analisado como teste preliminar.

Figura 3. Cromatograma do destilado da cerveja usando a metodologia HS-SMPE-GC-MS em estudos preliminares utilizando o modo scan.



Aplicou-se a HS-SPME utilizando o GC-MS em amostras de cerveja e do destilado de cerveja para a avaliação dos compostos de interesse (Tabela 2).

Tabela 2. Compostos da cerveja e do destilado identificados de acordo com os padrões.

Compostos presentes na cerveja	Compostos presentes no destilado
Acetato de etila	Acetato de etila
Etanol	Etanol
-	Álcool Isobutílico
Álcool Isoamílico	Álcool Isoamílico
Hexanoato de Etila	-
Acetato de 2-feniletila	-
Álcool fenílico	Álcool fenílico

Observa-se que apenas os compostos como acetato de etila, etanol, álcool isoamílico e álcool fenilético foram identificados e foram similares nos dois tipos de bebidas. O sabor da cerveja é uma mistura complexa de uma série de agentes aromatizantes potenciais que são muito influenciados pelas matérias-primas utilizadas e pelo método de produção empregado. Estudos mostram que etanol, dióxido de carbono, ésteres e álcoois superiores são compostos de aroma chave em cervejas lager americanas. (LEHNHARDT; GASTL; BECKER, 2019; MEILGAARD, 1975) Já o etanol, (R)-linalol, butanoato de etila, DMS, 3-metilbutanol, hexanoato de etila, 2-feniletanol e furaneol foram considerados significativos para o sabor geral em um estudo de recombinação de aroma sintético de cerveja pilsner. (LEHNHARDT; GASTL; BECKER, 2019) Considera-se que esses resultados do destilado foram apenas para obter uma avaliação preliminar, que apesar de ser do mesmo estilo de cerveja, não se tratava da mesma marca.

3.3. Análise de soluções padrão dos principais compostos presentes na cerveja e no destilado de cerveja usando a HS-SPME-GC-MS e a HS-SPME-GC/FID

Após os testes preliminares foram selecionados os principais compostos presentes na cerveja, realizou-se um mix com os mesmos e fez-se a otimização das condições cromatográficas. Na Tabela 3, têm-se os compostos de estudo de acordo com seu tempo de retenção nas condições do GC-MS e GC/FID, bem como a razão massa carga de acordo com a análise realizada no GC-MS.

Tabela 3. Compostos voláteis presentes na cerveja com seus respectivos tempos de retenção e a razão massa carga.

Compostos	Tempo de retenção		Íons monitorados/ m/z
	GC-MS (min)	GC/FID (min)	
Acetato de Etila	1,884	3,441	43/ 40/ 61
Etanol	2,633	4,536	45/ 46/ 43
Álcool isobutilico	7,231	9,038	43/ 45/ 73
Álcool isoamilico	9,914	10,804	55/ 42/ 70
Hexanoato de etila	10,373	11,528	88/ 43/ 60
1-pentanol	10,676	12,033	42/ 55/ 70
Octanoato de etila	13,120	14,293	88/ 41/ 57
Acetato 2-feniletil	16,544	17,177	43/ 91 / 65
Álcool fenílico	17,279	18,039	43/ 91 / 65

3.3.1. Efeito *Salting-Out*

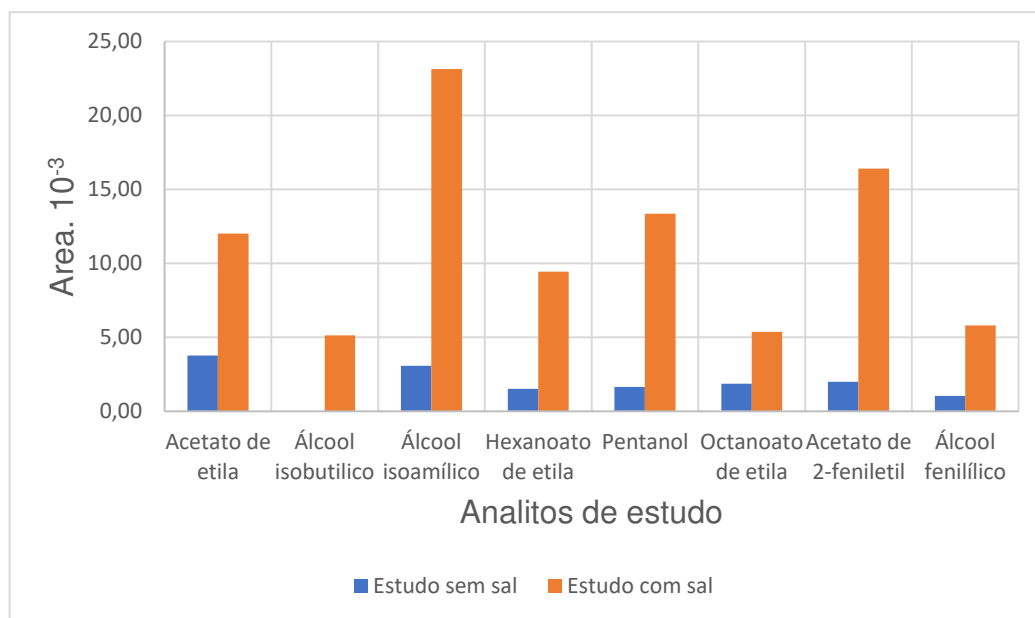
Avaliou-se o efeito *salting-out* da extração, verificando se o uso de NaCl favoreceria ou não a extração dos compostos voláteis presentes na cerveja. Para esse estudo foi utilizada a HS-SPME como técnica de extração e o GC-FID como técnica de análise. Na Tabela 4, tem-se os resultados desse estudo. De acordo com as médias das áreas, desvio padrão e coeficiente de variação, nota-se que os melhores resultados foram obtidos para as amostras com adição de sais.

Tabela 4. Efeito *salting-out* da extração HS-SPME dos compostos voláteis presentes na cerveja

Composto	Sem sal			Com sal		
	Média	Desvio	CV(%)	Média	Desvio	CV(%)
Acetato de etila	3763	1139	30,3	12025	886,	7,4
Etanol	183572,2	26864,97	14,63	587249,3	134154,6	22,8
Álcool isobutílico	-	-	-	5143,83	491,77	9,60
Álcool isoamílico	3076	353,90	11,50	23131,37	1741,09	7,5
Hexanoato de etila	1530,90	722,85	47,22	9441,15	1611,57	17,07
Octanoato de etila	1874,43	1044,01	55,70	5364,17	469,12	8,74
Acetato de 2-feniletil	1990,17	1097,92	55,17	16415,10	227,5	1,39
Álcool Fenílico	1055,07	525,25	49,78	5803,70	1062,21	18,30

Uma vez que o uso do cloreto de sódio proporcionou bons resultados em tais aplicações, também foi considerado neste estudo de comparação, os resultados relatados na Figura 4. Para todos os compostos investigados, o uso do cloreto de sódio proporcionou uma melhor extração ao compararmos a não utilização desse sal.

Figura 4. Resultados expresso em termos da razão entre as unidades de área dos picos obtidos a partir de compostos presentes nas bebidas de estudo usando sal e sem usar sal na análise HS-SPME-GC-FID de uma mistura padrão.



A adição de sal pode melhorar a eficiência da extração, uma vez que altera a solubilidade das moléculas em água. Em geral, a solubilidade de muitos compostos orgânicos diminui quando a concentração de sal é aumentada, principalmente os mais hidrofóbicos. Conseqüentemente a pressão parcial de vapor desses compostos será aumentada e com isso, eles serão direcionados para o headspace. A solubilidade de moléculas mais polares, por outro lado, pode permanecer inalterada ou aumentar através de interações eletrostáticas com os íons salinos. (SAISON et al., 2008)

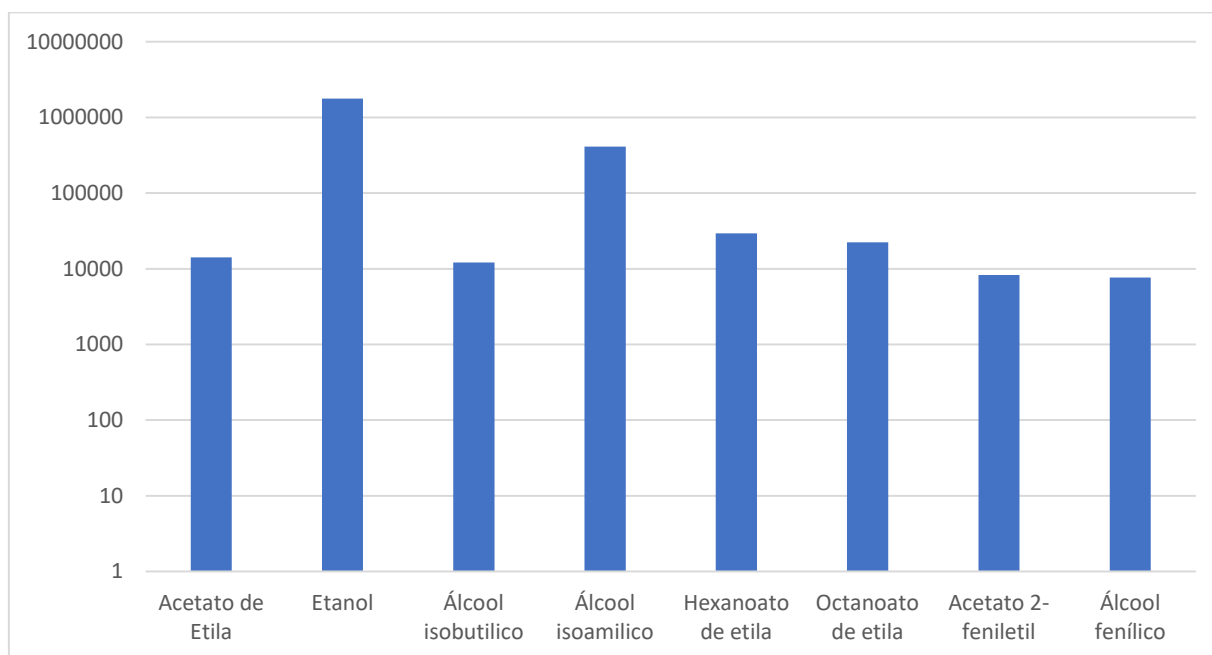
3.4. Avaliação comparativa do perfil volátil da cerveja durante as etapas da fabricação do destilado de cerveja

Aplicou-se a HS-SPME-GC/FID em amostras de cerveja (precursora do destilado) consideradas com gosto desagradável e do destilado de cerveja para a confirmação dos compostos de interesse.

Os valores médios das áreas para os 8 compostos orgânicos analisados no destilado produzido são apresentados na Figura 5. Ao se analisar os componentes químicos do destilado e comparando as áreas de todos os compostos presentes

nessa matriz, fez-se uma correlação desses compostos e foi observado que o etanol e o álcool isoamílico foram os compostos mais concentrados no destilado (Figura 5).

Figura 5. Correlação dos principais compostos extraídos do destilado submetidos à HS-SPME-GC-FID.



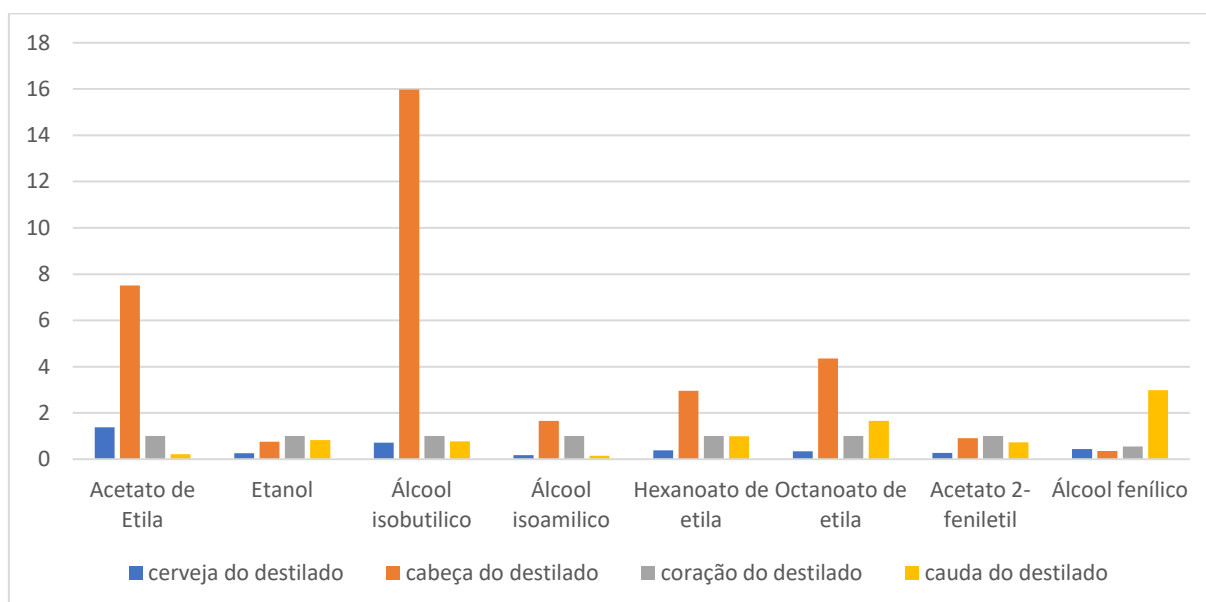
Estudos mostram que alguns dos compostos voláteis contribuem muito para o perfil sensorial. Ésteres como hexanoato de etila (maçã verde), octanoato de etila (frutado, com sabão) e acetato de feniletila (mel, frutado, floral) são ésteres que têm um impacto positivo no perfil de aroma de uma bebida alcoólica, (CASTRO; ROSS, 2015) no entanto, esses ésteres etílicos podem conferir um odor desagradável de vinagre azedo quando o nível de sabor limiar foi ultrapassado. (ATTCHELOUWA et al., 2020; VIANA et al., 2008) Para compostos alcoólicos, foi relatado que o etanol e o álcool feniletílico conferem o aroma das bebidas alcoólicas exibindo um sabor amargo, uma essência rosada, respectivamente. (ATTCHELOUWA et al., 2020)

Como o observado na tabela 1, o álcool isoamílico está ligado a uma característica de odor de álcool fusel, isso pode estar ligado ao fato de a bebida não ter sofrido um processo de envelhecimento. O envelhecimento confere também características importantes à bebida, indicando assim, que o tempo de armazenamento influi sobremaneira na qualidade final do destilado. Considerando que não foi levado em consideração o envelhecimento da bebida, talvez essa

alteração possa melhorar a qualidade e a aceitação do destilado produzida a partir da cerveja.

Ao se comparar todos os compostos presentes nas quatro matrizes, observou-se uma diferença quantitativa para os principais compostos analisados na cerveja e nas três frações produzidas durante o processo de destilação (Figura 6). Os valores médios das áreas para os 8 compostos orgânicos analisados nas três frações do destilado, produzidas pelo alambique destilação, são apresentados na Figura 6.

Figura 6. Comparação dos principais compostos extraídos na cerveja e nas frações cabeça, coração e cauda do destilado submetidos à HS-SPME-GC/MS.



A fração “cabeça” tende a carregar os compostos mais voláteis. Quando comparadas as concentrações dos 8 compostos nas frações, observa-se que a destilação concentra os compostos da cerveja na fração “cabeça” e ao se comparar com a fração “coração”, se observa que o primeiro corte reduziu essas concentrações. Já a fração “cauda” considera-se os compostos menos voláteis e com massa molar maior.

Observa-se que o acetato de etila (produtos típicos de cabeça, com PE < etanol, 78,5°C), álcool isobutílico, álcool isoamílico (álcoois superiores, interagem igualmente com a água e etanol) e ésteres como hexanoato de etila e octanoato de etila que as concentrações diminuem da cabeça para a cauda. Isto pode ser explicado pelo fato destes compostos, mais solúveis em etanol do que na água, tendem a se

concentrar na fração cabeça (SERAFIM et al., 2012). Conseqüentemente, os valores numéricos das medianas das concentrações diminuem na seqüência cabeça, coração e cauda. O mesmo não foi observado para o etanol, acetato 2-feniletil e álcool fenílico. Esperava-se que o metanol (mais volátil que o etanol) e o 2-butanol (álcool superior) estivessem presentes em maior concentração na fração cabeça. O ácido acético apresentou um perfil contrário aos demais compostos analisados por apresentar uma maior afinidade pela água do que pelo etanol.

4. CONCLUSÃO

Amostras de cerveja foram destiladas em alambiques. Neste trabalho, os métodos SPME-GC/MS e HS-GC/FID foram usados para monitorar da fabricação desse tipo de destilado. O uso de SPME é o mais vantajoso para extração de 8 compostos voláteis presentes em amostras de cerveja e destilados da cerveja. O estudo proposto mostrou que esses compostos apresentam concentrações distintas na cerveja e nas frações “cabeça”, “coração” e “cauda” Conclui-se assim, que esses compostos voláteis podem ser usados como autênticos marcadores para o desenvolvimento de estratégias quando uma cerveja está fora de um padrão de consumo aceitável.

5. REFERÊNCIAS

- ALVES, V. et al. Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. **Food Chemistry**, v. 326, n. November 2019, p. 126856, 2020.
- APARICIO-RUIZ, R. et al. Comparison of two analytical methods validated for the determination of volatile compounds in virgin olive oil : GC-FID vs GC-MS. **Talanta**, v. 187, n. May, p. 133–141, 2018.
- ATTCHELOUWA, C. K. et al. Characterisation of volatile compounds associated to sensory changes during the storage of traditional sorghum beer by HS-GC / FID and SPME-GC / MS. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, n. November 2019, 2020.
- CASTRO, L. F.; ROSS, C. F. Determination of flavour compounds in beer using stir-bar sorptive extraction and solid-phase microextraction. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 2, p. 197–203, 2015.
- GIANNETTI, V. et al. Flavour fingerprint for the differentiation of Grappa from other Italian distillates by GC-MS and chemometrics. **Food Control**, v. 105, n. February, p. 123–130, 2019.
- JELEŃ, H. H.; MAJCHER, M.; SZWENGIEL, A. Key odorants in peated malt whisky and its differentiation from other whisky types using profiling of flavor and volatile compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v. 107, n. March, p. 56–63, 2019.
- LEHNHARDT, F.; GASTL, M.; BECKER, T. Forced into aging: Analytical prediction of the flavor-stability of lager beer. A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2642–2653, 2019.
- LÓPEZ-VÁZQUEZ, C. et al. Determination of aldehydes as pentafluorobenzyl derivatives in grape pomace distillates by HS-SPME-GC / MS. **Food Chemistry**, v. 130, p. 1127–1133, 2012.
- LÓPEZ-VÁZQUEZ, C. et al. Fast determination of principal volatile compounds in distilled spirits. **Food Control**, v. 21, p. 1436–1441, 2010.
- MEILGAARD, M. C. Flavor chemistry of beer. II. Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. **Tech. Quart. Master. Brew. Assoc. Am.**, v. 12, p. 151–168, 1975.
- PEREIRA, A. R. F. B. **Produção de bebidas espirituosas tendo como base a destilação artesanal**. 2018. 64 f. Taylor & Francis, 2018.
- PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; SANTOS, H. M. L. M. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1121, p. 145–153, 2006.

RUGANI, B. **Environmental Externalities in Global Trade for Wine and Other Alcoholic Beverages**. Belvaux, Luxembourg: Elsevier, 2019. v. 1. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21974-4>>.

SAISON, D. et al. Optimisation of a complete method for the analysis of volatiles involved in the flavour stability of beer by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1190, p. 342–349, 2008.

SERAFIM, F. A. T. et al. Comparação do perfil químico entre cachaças de um mesmo vinho destiladas em alambiques e em colunas. **Quim. Nova**, v. 35, n. 7, p. 1412–1416, 2012.

SERAFIM, F. A. T.; SEIXAS, F.; GALINARO, C. Correlation between Chemical Composition and Sensory Properties of Brazilian Sugarcane Spirits (Cachacas). **J. Braz. Chem. Soc.**, n. January 2015, 2013.

SOUZA, P. P. De et al. Brazilian cachaça : “ Single shot ” typification of fresh alembic and industrial samples via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. **Food Chemistry**, v. 115, n. 3, p. 1064–1068, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.026>>.

VIANA, F. et al. Rational selection of non- *Saccharomyces* wine yeasts for mixed starters based on ester formation and enological traits. **Food Microbiology journal**, v. 25, p. 778–785, 2008.

WEISS, T. et al. Production of distilled spirits using grain sorghum through liquid fermentation. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 9, n. April, p. 100314, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100314>>.

WU, J. et al. Journal of Food Composition and Analysis Recent advances in the understanding of off-flavors in alcoholic beverages : Generation , regulation , and challenges. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 103, n. February, p. 104117, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104117>>.

ZANELLA, D. et al. Comparison of headspace solid-phase microextraction high capacity fiber coatings based on dual mass spectrometric and broadband vacuum ultraviolet absorption detection for untargeted analysis of beer volatiles using gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 1141, p. 91–99, 2021.

CAPÍTULO 2. EMPREGANDO DIFERENTES TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS DE CERVEJA

1. INTRODUÇÃO

Bebidas alcoólicas, como a cerveja, são formadas por compostos químicos voláteis, semivoláteis e não voláteis que desempenham papel crucial na aparência, sabor e aroma das mesmas (ATTCHELOUWA et al., 2020). A qualidade da cerveja é muitas vezes avaliada com base no seu sabor e aroma, que é um dos parâmetros cruciais que influenciam a aceitação pelo consumidor. Os compostos presentes na cerveja, sejam eles voláteis (ou seja, aldeídos, cetonas) ou não voláteis (sais orgânicos, açúcares, aminoácidos e ácidos orgânicos/inorgânicos) são essenciais para o perfil organoléptico da cerveja. (DACK et al., 2017)

O sabor da cerveja é uma característica muito complexa, uma vez que está relacionado às inúmeras reações oxidativas e não oxidativas que podem ocorrer durante o armazenamento da cerveja. Além disso, o sabor pode ser influenciado pela matéria-prima utilizada, pelo método de produção empregado, pela contaminação por microorganismos e pelas condições inadequadas de armazenamento, como oxigênio e exposição à luz solar. (HUMIA et al., 2019; LEHNHARDT; GASTL; BECKER, 2019)

Conseqüentemente, uma maior atenção está sendo oferecida aos estudos que permitem relacionar os aromas desejáveis e indesejáveis na cerveja, aos chamados *flavours* e *off-flavours* respectivamente. (LEHNHARDT; GASTL; BECKER, 2019)

A análise de diversos compostos em cervejas é importante e exige métodos confiáveis, rápidos, simples e de baixo custo. Metodologias baseadas em Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (RODRÍGUEZ-CÁCERES et al., 2017) e cromatografia gasosa (GC) (FERREIRA et al., 2022; ZANELLA et al., 2021), em combinação com diferentes tipos de detectores, são os métodos mais úteis e populares para análise qualitativa e quantitativa dos mais variados compostos da cerveja. No entanto, para obter condições ideais de análise, geralmente é necessária uma etapa de preparação da amostra. Esta preparação pode incluir desde a etapa de extração / limpeza até procedimentos de pré-concentração e derivatização dos analitos. (ALMEIDA; FERNANDES; CUNHA, 2012)

A microextração em fase sólida (SPME) é uma das principais técnicas para a análise de compostos voláteis na cerveja (ALVES et al., 2020; FERREIRA et al., 2022; GIANNETTI et al., 2019). A SPME tem como base a distribuição dos analitos entre a amostra e a fase extratora (fibra), combinando amostragem, isolamento e enriquecimento em uma única etapa (DIAS et al., 2013; SUTÉRIO et al., 2018). O revestimento de fibra é a chave da SPME uma vez que está relacionada com a seleção e eficiência de extração dos diferentes compostos voláteis. Estudos com a fibra divinilbenzeno-carboxeno-polidimetilsiloxano (DVB-Car-PDMS) mostram que esse tipo de fibra tem provado ser a mais adequada para o isolamento de uma ampla gama de compostos voláteis (PINHO, O.; FERREIRA; SANTOS, 2006). Um das limitações da técnica é o alto custo da fibra, além da sua fragilidade (HERRINGTON et al., 2020). Levando fatores como esse em consideração, a utilização de técnicas de extração alternativas para a determinação de compostos da cerveja se mostra necessária.

A extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) tem sido apontada como uma ótima ferramenta de extração de compostos orgânicos em várias matrizes como mel, (DE PINHO, G. P. et al., 2010) leite (GOULART et al., 2008) e água (VIEIRA, H. P.; NEVES; QUEIROZ, 2007). O método se baseia na partição dos analitos entre a fase aquosa e orgânica resultante da redução da temperatura durante o congelamento. Uma das vantagens da técnica é que por se tratar de uma extração em fase única, os analitos são extraídos da amostra no rompimento do equilíbrio da mistura homogênea pela diminuição da temperatura. Conseqüentemente, a fase aquosa é congelada e a fase orgânica contendo os analitos é facilmente removida. Dessa forma, a técnica se torna simples, em virtude do processo de extração não necessitar de outras etapas de purificação (DE PINHO, G. P. et al., 2010). (DE PINHO, G. P. et al., 2010)

A microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) também apresenta uma abordagem mais simples para a análise de compostos da cerveja (ALMEIDA; FERNANDES; CUNHA, 2012). A DLLME consiste na formação de uma solução turva promovida pela rápida adição de uma mistura contendo pequenos volumes de um solvente extrator e de um solvente dispersor a uma amostra aquosa. As minúsculas gotículas do solvente extrator formadas e dispersas na solução da amostra aquosa são reunidas por centrifugação, permitindo grandes fatores de enriquecimento. (PARENTE et al., 2022; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010) Este procedimento tem

sido aplicado com sucesso para extração de compostos como hidrocarbonetos aromáticos (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010), aminas aromáticas (ALMEIDA; FERNANDES; CUNHA, 2012; FARAJZADEH et al., 2009) e resíduos de pesticidas. (JING et al., 2021)

Considerando que a LLE/LTP tem a capacidade de *clean up* das amostras e a DLLME a vantagem do enriquecimento, a hifenação das duas técnicas pode ser uma forma promissora de investigar compostos voláteis e semivoláteis na cerveja, uma vez que ambas as técnicas são simples, rápidas e de baixo custo.

Visando obter um melhor perfil de compostos voláteis e semivoláteis da cerveja, o presente trabalho otimizou diferentes técnicas de extração (HS-SPME, LLE/LTP e LLE/LTP-DLLME) associadas à cromatografia gasosa/espectrometria de massas (GC-MS), para assim obter o maior número de compostos possível, bem como saber qual a técnica ideal de acordo com o composto a ser analisado.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes e soluções

Os solventes acetonitrila (ACN) (99,5% - grau HPLC) e acetato de etila (ACT) (99,5%) usados nas extrações foram adquiridos da Sigma-Aldrich, (USA, CAS 75-05-8) e da VETEC (Brasil, CAS 141-78-6) respectivamente. O sal cloreto de sódio adquirido da Êxodo Científica, (Brasil, CAS 7647-14-5) também foi utilizado.

2.2. Amostras

Para otimização do método foram analisadas amostras de cerveja estilo pilsen puro malte de um mesmo estilo de uma determinada marca adquiridas no comércio local de Viçosa-MG. Depois que as diferentes condições do método foram otimizadas, os diferentes estilos de cerveja foram submetidos a aplicação do melhor método. O estudo foi realizado em duplicata. As amostras foram acondicionadas em geladeira (3 ± 1 ° C) até o momento das análises.

2.3. Instrumentos e aparelhos

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás (GC Shimadzu, modelo GC 2010 Plus, Japão) equipado com um amostrador automático (Shimadzu, modelo, AOC-5000 Plus, Japão), acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu, modelo GC-MS-QP2010 Plus, Japão).

Outros equipamentos usados foram um agitador vórtex (Certomat® MV – B. Braun Biotech International), centrífuga (Quimis®), balança analítica (Modelo AX200, Shimadzu, Japão), micropipetas com capacidades de 50–10000 µL (Gilson, Middleton, EUA), uma geladeira (Brastemp) e um freezer (Consul, modelo 280, São Paulo, Brazil).

2.4. Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu, modelo QP2020, Japão) e equipado com um amostrador automático (Shimadzu, modelo, AOC-20i, Japão). O Hélio (99,999%, White Martins, Brasil) foi usado como gás de arraste a uma velocidade linear constante de 46,2 cm s⁻¹. A temperatura do injetor e do detector foram mantidas a 250 °C. Um volume de 1 µL foi injetado no modo splitless com um tempo de amostragem de 60 s. A separação foi realizada em uma coluna capilar 5% fenil:95% dimetilpolisiloxano com 30 m de comprimento; 0,25 mm de diâmetro interno e 0,10 µm de espessura de filme. A programação de temperatura da coluna para as análises de cerveja usando a SPME consistiu em manter a temperatura inicial de 42 °C por 5 min e depois elevando a uma taxa de 3 °C por minuto até atingir 200 °C, permanecendo nessa temperatura por 5 min. O tempo de análise foi de 62,67 min.

Já as condições cromatográficas para as análises de compostos de cerveja por LLE/LTP e por DLLME foram: temperatura inicial de 31 °C, a qual foi mantida por 5 min e depois elevada a uma taxa de 2 °C por min até atingir 40 °C, permanecendo nessa temperatura por 1 min. Posteriormente, a temperatura foi elevada a uma taxa de 2 °C por minuto até atingir 200 °C, mantendo essa temperatura por 2 min, aumentando-se em seguida até a temperatura a 290 °C usando uma taxa de 10 °C por min e permanecendo nessa temperatura por 3 min. A injeção foi feita no modo *splitless* e o tempo de corrida foi de 83,00 min. As temperaturas do injetor, da interface

do detector e da fonte de ionização foram mantidas em 250 °C. Um tempo de corte de 5,0 min foi definido para evitar danos ao instrumento.

Os compostos da cerveja foram identificados comparando-se os tempos de retenção dos picos obtidos para os extratos das amostras com os dos padrões e pelo espectro de massas. O espectrômetro de massas (MS) foi operado em modo de ionização por impacto de elétrons 70 eV, usando Hélio (99,999%, White Martins, Brasil) como gás de arraste. As análises foram feitas no modo *Scan* ou TIC (*total ion chromatogram* - cromatograma de íons totais) obtendo os tempos de retenção (t_R), as áreas, a razão m/z e os possíveis nomes de compostos com probabilidade mínima de 70% de identificação da substância acordo com *Mass Spectral library* (NIST 14).

2.5. Extrações de compostos voláteis e semivoláteis na cerveja.

2.5.1. Microextração em fase sólida no *headspace* (HS-SPME)

O método baseado na HS/SPME-GC-MS desenvolvido por Pinho e colaboradores (2006) foi modificado e empregado para a extração de compostos voláteis de uma cerveja estilo pilsen puro malte.

Inicialmente foi avaliada a extração dos compostos voláteis da cerveja utilizando a fibra DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano) (Supelco) 50/30 μm e a fibra PDMS (Polidimetilsiloxano) 100 μm (Supelco). Nesse estudo 5,00 mL de amostra de cerveja foram colocados em um frasco de *headspace* de 22,00 mL contendo cerca de 2,00 g de NaCl. Os frascos de amostra foram mantidos por um tempo de incubação de 30 min e em uma temperatura de 20 °C. Após esse tempo a fibra foi exposta ao *headspace* por mais 30 min. Posteriormente, a fibra foi recolhida e o dispositivo SPME removido do frasco e inserido no injetor do sistema GC-MS. Durante o processo de injeção, a fibra foi mantida exposta por 2 min para dessorção térmica dos analitos.

Depois de selecionada a fibra, um estudo com diferentes temperaturas (20 °C, 30°C e 40°C) de incubação na câmara acoplada ao banho termostático também foi realizado. Ambos os estudos foram realizados em duplicata.

2.5.2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Para avaliar essa técnica, a tubos falcon de 15 mL capacidade adicionou-se 1,00 mL de cerveja, diferentes volumes de água (4 ou 5 mL), com e sem adição de 1 g de NaCl, 1 mL de Acetonitrila (ACN – solvente dispersor) e 120 µL de tolueno (TOL – solvente extrator). Os tubos foram agitados por 30 s em vórtex e depois centrifugados por 5 min. Os ensaios foram realizados em triplicata.

2.5.3. Otimização da extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP)

A otimização da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP), para análise de compostos voláteis e semivoláteis em amostras de cerveja, foi realizada empregando 4,00 mL de cerveja, que foi colocada em contato com a solução extratora conforme descritos na Tabela 2.1 e na Tabela 2.2. Após agitação em vórtex, por 1 minuto, a mistura foi resfriada por 6 horas em *freezer* a -20 °C para separação das fases pelo congelamento/resfriamento da fase aquosa. O extrato orgânico foi coletado, transferido para um vial e analisado por GC-MS.

O estudo de otimização foi realizado em duas etapas. Inicialmente, foram realizadas análises para avaliar a influência das variáveis (abaixo nas tabelas 2.1. e 2.2.) que extraía a maior quantidade de compostos nas amostras de cerveja. Na primeira etapa foram avaliados o uso de sal para promover o efeito *salting out*, assim como a proporção entre os volumes de acetonitrila e amostra de cerveja. Na segunda etapa, foram avaliados a alteração da polaridade do solvente extrator, alterando a proporção entre os solventes acetonitrila e acetato de etila (ACN:ACT), a proporção desses solventes com a amostras (SOL:AM) e uso ou não do sal (NaCl).

2.5.3.1. Efeito da adição de NaCl na extração de compostos de amostras de cerveja

Nessa primeira etapa foram realizados quatro ensaios (A, B, C e D) alterando a proporção de amostra e acetonitrila (ACN:AM), assim como o uso ou não de cloreto de sódio (NaCl), conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Experimentos realizados para avaliar a proporção de acetonitrila e amostra e o uso ou não de cloreto de sódio

Ensaio	Proporção ACN:AM	Uso de NaCl
A	1:1	Sem sal
B	2:1	Sem sal
C	1:1	Com sal
D	2:1	Com sal

Legenda: ACN- Acetonitrila; AM- Amostra de cerveja

Na segunda etapa, foram realizados experimentos visando avaliar o efeito da alteração da polaridade da fase orgânica e da adição de sal na extração dos compostos presentes na cerveja. Acetato de etila foi adicionado à acetonitrila (solvente extrator), e cloreto de sódio (NaCl) foi usado para alterar a força iônica do sistema. Esses ensaios foram nomeados de E, F, G, H e I e são descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Experimentos realizados para avaliar a proporção de solvente: amostra de cerveja (SOL:AM), acetonitrila:acetato de etila (ACN:ACT) e o uso ou não de cloreto de sódio.

Ensaio	Proporção SOL:AM	Proporção ACN:ACT	Uso de NaCl
E	1:2	1:0	Sem sal
F	1:2	1:0	Com sal
G	1:1	4:1	Sem sal
H	1:1	4:1	Com sal
I	1:2	4:1	Sem sal
J	1:2	4:1	Com sal

Legenda: SOL- Solvente; ACN- Acetonitrila; ACT- Acetato de etila; AM- Amostra de cerveja.

As condições experimentais que levaram à extração de um maior número de compostos foram utilizadas para a análise de outros estilos de cerveja de uma mesma marca.

2.5.4. Extração líquido-líquido com partição em baixa (LLE/LTP) hifenada a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Visando a pré-concentração e melhoria da identificação dos compostos presentes na cerveja, avaliou-se a possibilidade de hifenação das técnicas LLE/LTP com a DLLME.

Essa hifenação foi realizada aplicando a LLE/LTP aplicando os ensaios de A-J como de acordo com as condições apresentadas na Tabela 1 e Tabela 2 (item **2.3.2.**). Retirou-se posteriormente uma alíquota de 1,00 mL do extrato proveniente da LLE/LTP e a mesma era submetida à DLLME.

O procedimento foi realizado da seguinte forma: em tubos tipo falcon, com 22,00 mL de capacidade, contendo 5,00 mL de água ultrapura, foram injetados, com auxílio de uma seringa, 1,00 mL do extrato da LLE/LTP (obtido a partir do item **2.3.2.**) e 120 μ L de tolueno. Os tubos foram agitados por 30 s em vórtex e depois centrifugados por 5 min. Cerca de 100 μ L do extrato, obtidos da parte superior do frasco, foram retirados e colocados em um vial contendo um *insert* de 200 μ L e analisado por GC-MS.

O método que forneceu a extração de maior número de compostos também foi utilizado para a análise de outros estilos de cerveja de uma mesma marca.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Microextração em fase sólida no headspace (HS-SPME)

A microextração em fase sólida no *headspace* foi utilizada para extrair os compostos voláteis da cerveja. Nesta técnica, o objetivo não é realizar uma extração exaustiva, mas uma extração em condições de pré-equilíbrio, a fim de minimizar o tempo de extração, maximizando a eficiência da mesma (QUEIROZ, 2009; VIEIRA, A. C. et al., 2020).

Como a HS-SPME é uma técnica baseada no equilíbrio do analito com as fases, alguns parâmetros foram estudados, tais como: tipo de fibra e temperatura de equilíbrio/extração.

3.1.1. Tipos de fibras

O parâmetro mais importante para o desenvolvimento da SPME é a escolha do revestimento de fibra, já que sua polaridade e as características química dos componentes da amostra extraídos influenciam na eficiência de extração da técnica. (CHARRY-PARRA; DEJESUS-ECHEVARRIA; PEREZ, 2011; RODRIGUES; CALDEIRA; CAMARA, 2008) Como, neste caso, para determinar um perfil de compostos voláteis característicos da cerveja deseja-se selecionar uma fibra que permita extrair uma ampla variedade de compostos. Para isso, dois tipos de fibras, DVB/CAR/PDMS (divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano) de polaridade mista e PDMS (Polidimetilsiloxano) apolar, foram selecionadas para investigar compostos voláteis de cerveja. Os resultados das análises são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Análise dos compostos presentes na cerveja extraídos com as fibras DVB/CAR/PDMS 50/30 µm e PDMS 100 µm pelo método de HS-SPME-GC/MS.

Grupo de Compostos	Fibra	
	DVB-CAR-PDMS	PDMS
Ácido	Ácido propaneidióico dihidroxi	—
	1-butanol, 2-metil	—
Álcool	1-butanol, 3-metil	1-butanol, 3-metil
	2- Álcool feniletílico	2- Álcool feniletílico
	Etanol	Etanol
	3-Butenamida	—
Amida	1-butanol, 2-metil, acetato	—
	1-butanol, 3-metil, acetato	1-butanol, 3-metil, acetato
	Ácido acético, éster 2-feniletílico	Ácido acético, éster 2-feniletílico
	Acetato de etila	Acetato de etila
	—	Ácido decanóico, éster etílico

	—	Ácido hexanoico, éster etílico
	Ácido octanóico, éster etílico	Ácido octanóico, éster etílico
Outros	Ácido carbâmico, monoamônio	—

O revestimento de fibras mostrou-se determinante para avaliar o perfil dos componentes voláteis da cerveja obtidos pela técnica HS-SPME no presente estudo. Estes resultados estão em acordo com os obtidos nos trabalhos de Biazon e colaboradores (2009) e Vieira e colaboradores (2020) que constataram que fibras mistas divinilbenzeno-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS; 50/30 μm) e divinilbenzeno-polidimetilsiloxano (DVB/PDMS) são mais eficientes para extrair uma maior quantidade de compostos voláteis da cerveja.

Observa-se na tabela 3 que na fibra DVB/CAR/PDMS foram extraídos maior número de compostos voláteis da cerveja, que são, em sua maioria, polares, como álcoois, ácidos carboxílicos, fenóis, ésteres e amidas. Dos compostos encontrados para a fibra em estudo DVB/CAR/PDMS destacam-se os álcoois e ésteres, que provavelmente são majoritários por serem produzidos durante a fermentação do mosto e armazenamento da cerveja. Sendo que, os ésteres estão relacionados ao sabor frutado da cerveja e os álcoois ao aroma, favorecendo a fragrância da mesma. (JI, 2021)

No entanto, vale a pena ressaltar, que mesmo não atingindo os resultados desejados para o estudo a fibra PDMS também extraiu alguns dos compostos semelhantes ao da PVB/CAR/PDMS. Além de obter mais dois ésteres não extraídos por ela, provavelmente devido ao tamanho da cadeia dessas moléculas serem maiores e conseqüentemente mais apolar do que os ésteres de cadeia curta. No entanto, entende-se que para obter um melhor perfil de substâncias voláteis e assim estudar as diferentes composições da cerveja é necessário extrair maior quantidade de compostos. Sendo assim, optou-se por trabalhar com a DVB/CAR/PDMS. Esse revestimento também foi utilizado por Jiao e colaboradores (2011) para um estudo de perfil característico do sabor da cerveja por HS-SPME-GC/FID em 28 distintas amostras de cerveja e *chopp*. Sendo possível identificar 18 compostos voláteis característicos. (JIAO et al., 2011) E, caso necessário ampliar o estudo para

compostos de caráter apolar sugere-se desenvolver um estudo com o uso da membrana PDMS.

3.1.2. Temperaturas de extração

A temperatura de incubação é outro fator relevante para a otimização da técnica, uma vez que pode influenciar não só no número de compostos extraídos, mas também na composição do perfil obtido. (RODRIGUEZ-BENCOMO et al., 2012) Diante disso, neste estudo as temperaturas 20 °C, 30 °C e 40 °C foram testadas para extração dos compostos voláteis da cerveja por HS-SPME-GC-MS. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4 e, nela foi possível observar que foram encontrados os mesmos grupos de compostos da Tabela 3 (álcoois, ácidos carboxílicos, fenóis, ésteres e amidas) para as 3 temperaturas em estudo.

Tabela 4. Compostos extraídos da cerveja empregando a técnica HS-SPME com a fibra DVB-CAR-PDMS em diferentes temperaturas.

Grupo de compostos	Temperatura		
	20 °C	30 °C	40 °C
Ácido	Ácido propanoico dihidroxilado	–	–
	1-butanol, 2-metil	1-butanol, 2-metil	1-butanol, 2-metil
Álcool	1-butanol, 3-metil	1-butanol, 3-metil	1-butanol, 3-metil,
	Álcool 2-feniletílico	2- Álcool feniletílico	
	–	–	2,3- Butanodiol
	Etanol	Etanol	Etanol
	3-Butenamida	–	–
Amina	–	–	Dimetilamina
	1-butanol, 2-metil, acetato	–	–
	1-butanol, 3-metil, acetato	1-butanol, 3-metil, acetato	1-butanol, 3-metil, acetato

Éster	Ácido acético, éster 2-feniletílico	Ácido acético, éster 2-feniletílico	Ácido acético, éster 2-feniletílico
	Acetato de etila	—	—
	Ácido octanóico, éster etílico	Ácido octanóico, éster etílico	
Outros	Ácido carbâmico, monoamónio	Ácido carbâmico, monoamónio	—

No entanto, mesmo que as 3 temperaturas possibilitem a extração de compostos similares, houve uma diminuição no número de compostos extraídos com o aumento da temperatura. Isso pode ser justificado pelo fato de que o aumento da temperatura causa a formação de artefatos que provavelmente resultam na oxidação química da cerveja. (ZANELLA et al., 2021) Ou pelo fato de que temperaturas mais elevadas podem levar à perda dos compostos mais voláteis, tornando os resultados menos confiáveis para a extração de substâncias características. Assim como observado por Saison e colaboradores (2008).

Sendo assim, considerando que o objetivo do estudo é obter o melhor perfil de compostos característico da cerveja optou-se por trabalhar com a fibra DVB-CAR-PDMS e menor temperatura de incubação 20 °C a fim de obter o maior número de substâncias, o que possibilitaria caracterizar as amostras de cerveja de maneira mais eficiente.

3.2. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Afim de avaliar de forma mais completa e precisa os componentes presentes na cerveja, traçando de forma mais adequada seu perfil de substâncias características. Buscou-se um método que possuísse eficiência para extração de compostos voláteis e semivoláteis. Um exemplo de compostos presentes nessa categoria são os álcoois superiores, que são responsáveis por sabores característicos da cerveja, possuem no mínimo 2 átomos de carbono (1-propanol, 2-metil-1-propanol (isobutanol), 3-metil-1-butanol (isoamilol) e 2-feniletanol) e podem valorizar ou não o sabor da cerveja. É uma técnica que foi amplamente utilizada para a análise destes e outros compostos em bebidas alcoólicas (FONTANA; TORO; ALTAMIRANO, 2011;

XIONG; HU, 2008) e cerveja (ALMEIDA; FERNANDES; CUNHA, 2012; XU et al., 2011) foi a DLLME.

Diante disso, optou-se por prosseguir com essa técnica para ampliar o número de substâncias que irão compor nosso perfil. Para isso, utilizou-se a acetonitrila como solvente dispersor, por ser miscível tanto na fase orgânica (solvente extrator) quanto na fase aquosa (amostra), e o tolueno como solvente extrator.

No entanto, ao aplicar a técnica DLLME diretamente em amostras de cerveja, percebeu-se que havia a formação de emulsão, o que não permitiu a recuperação do solvente extrator e, conseqüentemente, que as análises por GC-MS fossem realizadas. Testou-se mudanças nos parâmetros estudados (solvente extrator, diluição da amostra com água e força iônica da solução), mas as alterações não foram suficientes para viabilizar o uso direto desta técnica de extração. Levando isso em consideração, optou-se por investigar outra técnica de extração, como a extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP), a qual poderia ser posteriormente hifenada à DLLME, para fornecer melhores resultados. Assim a próxima etapa deste estudo foi otimizar a técnica LLE/LTP.

3.3. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) e análise de cervejas por GC-MS

Inicialmente, a LLE/LTP foi pensada como uma etapa que antecederesse a DLLME, a fim de que esta técnica promovesse um *clean-up* da amostra e tornasse a execução da DLLME possível. Assim, seria possível analisar os compostos que não foram observados na HS-SPME, sejam eles voláteis ou semi-voláteis. No entanto, durante a execução dos ensaios os autores resolveram considerar a possibilidade de que a LLE/LTP poderia extrair compostos distintos da DLLME. Sendo assim, além do extrato obtido na hifenação das técnicas (LLE/LTP-DLLME), também houve o desenvolvimento e análise dos obtidos na etapa de *clean-up* (LLE/LTP).

Nos estudos preliminares utilizados para avaliar a viabilidade da LLE/LTP foram utilizados 4 mL de acetonitrila e 4 mL de cerveja. Neste teste, compostos como Acetic acid, cyano; 2,3-Butanediol, [R-(R*,R*)]-; 1-Butanol, 3-methyl-, acetate; Glycerin e Phenylethyl alcohol foram extraídos. Piornos e colaboradores (2019) identificaram esses compostos, exceto a glicerina, em seus estudos, os quais são considerados os

compostos de aroma tipicamente encontrados na cerveja.(PIORNOS et al., 2019) Considerando esse resultado, pode-se vislumbrar o potencial de se empregar a LLE/LTP para estudar os compostos presentes na cerveja.

A fim de melhorar a extração e avaliar a possibilidade de se extrair um maior número de compostos, inicialmente avaliou-se a proporção de amostra e acetonitrila (ACN:AM) e o uso ou não de NaCl (ensaios de A-D) na LLE/LTP. Os resultados encontram-se na Tabela 5 e na Figura 1. Analisando os resultados obtidos observou-se que diminuir o volume de amostra prejudicou a extração tanto em quantidade de composto extraídos, quanto na diminuição de área desses compostos. A adição de sal não alterou (experimento A e C) ou diminuiu (Experimento B e D) no quesito quantidade. No entanto, a adição de sal promoveu melhora da extração dos analitos no quesito área, uma vez que houve um aumento destas nos compostos extraídos. Uma possível explicação para os resultados obtidos para a diminuição dessa eficiência de extração com a redução do volume de amostra pode estar relacionada aos princípios de transferência de massa do processo. A maior proporção de solvente/amostra pode resultar em maior gradiente de concentração durante a difusão, uma vez que os analitos (solutos) terão maiores tendências a deixar a matriz e passar para o solvente. (REZAEI et al., 2013)

Já em relação ao uso de sal, a presença de cloreto de sódio diminui a solubilidade da acetonitrila na água, favorecendo a separação das fases, mesmo que esse sal dificulte o congelamento da fase aquosa pelo abaixamento da temperatura. Outro fator a ser considerado está relacionado com a precipitação de proteínas na amostra pela adição de sal. Estima-se que a cerveja possui uma quantidade de proteína entre 10% a 12%. (CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2003) Sendo assim, o melhor ensaio seria o ensaio A, em que foram utilizados 4 mL de amostra e 4 mL de solvente, sem adição de sal.

Considerando as vantagens quanto ao uso de sal no primeiro estudo optou-se por reavaliar a eficácia de seu uso na extração ao potencializar seu efeito ou não com a alteração da polaridade da fase orgânica. Para isso, alterou-se a polaridade da fase orgânica (FO – ACN) e da força iônica da fase aquosa (FA – amostra), através da adição ou não acetato de etila na FO e de NaCl na FA. Nesse estudo, o volume da amostra foi mantido constante (4 mL), o volume de FO foi alterado, sendo que este

valor menor ou igual ao volume de amostra, já que valores menores de AM não favoreceram a extração, como visto nos ensaios A-D.

A proporção (SOL:AM) foi alterada com a variação do volume de fase orgânica e sua composição (ACN:ACT), e para o estudo da força iônica 1,000 g de sal foi adicionado aos ensaios. Os resultados destes estudos encontram-se na Tabela e na Figura 1, e são representados pelos ensaios E, F, G, H e I.

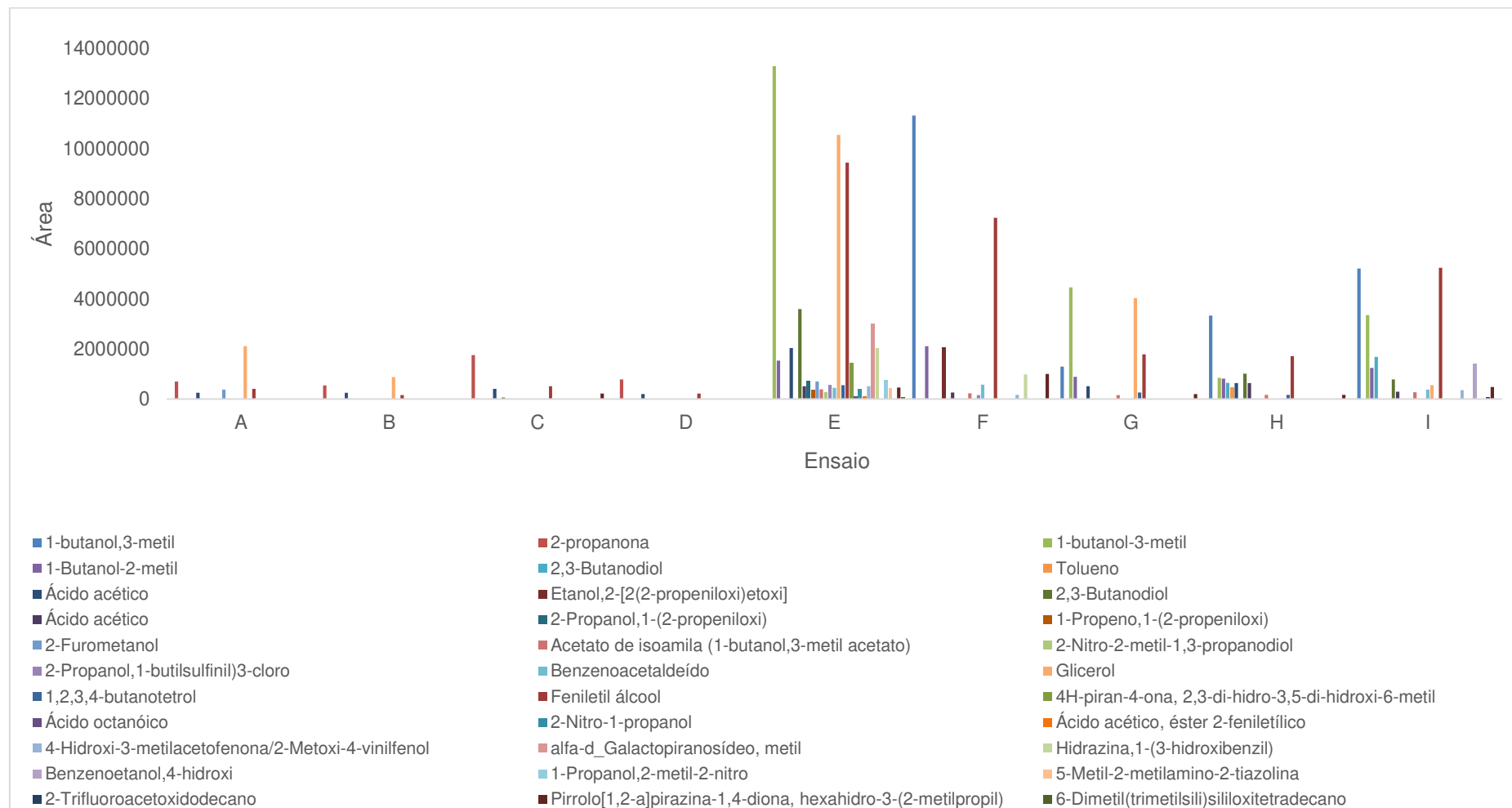
Tabela 5. Tabela dos resultados da análise de LLE/LTP em diferentes condições de acordo com o tempo de retenção e a média das áreas dos compostos

Composto	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1-butanol,3-metil						X	X	X	X
2-propanona	X	X	X	X					
1-butanol-3-metil					X		X	X	X
1-Butanol-2-metil					X	X	X	X	X
2,3-Butanodiol								X	X
Tolueno								X	
Ácido Acético	X	X	X	X	X		X	X	
Etanol,2-[2(2-propeniloxi)etoxi]						X			
2,3-Butanodiol			X		X			X	X
2-Propanol,1-(2-propeniloxi)					X				
1-Propeno,1-(2-propeniloxi)					X				
2-Furometanol	X				X				
Acetato de isoamila (1-butanol,3-metil acetato)					X	X	X	X	X
2-Nitro-2-metil-1,3-propanodiol					X	X			
2-Propanol,1-butilsulfinil)3-cloro					X	X			
Benzenoacetaldeído					X	X			X
Glicerol	X	X			X		X		X

1,2,3,4-butanotetrol					X		X	X	
Feniletilálcool	X	X	X	X	X	X	X	X	X
4H-piran-4-ona, 2,3-di-hidro-3,5-di-hidroxi-6-metil					X				
Ácido octanóico					X				
2-Nitro-1-propanol					X				
Ácido acético, éster 2-feniletílico					X				
4-Hidroxi-3-metilacetofenona/2-Metoxi-4-vinilfenol					X	X			X
alfa-d_Galactopiranosídeo, metil					X				
Hidrazina,1-(3-hidroxibenzil)					X	X			
Benzenoetanol,4-hidroxi									X
1-Propanol,2-metil-2-nitro					X				
5-Metil-2-metilamino-2-tiazolina					X				
2-Trifluoroacetoxidodecano									X
Pirrolo[1,2-a]pirazina-1,4-diona, hexahidro-3-(2-metilpropil)			X		X	X	X	X	X
6-Dimetil(trimetilsili)sililoxitetradecano					X				
Total de Compostos encontrados	5	4	5	3	26	11	9	11	13

Legenda: A- 4 mL de ACN + 4 mL de amostra; B- 4 mL de ACN + 2 mL de amostra; C- 4 mL de ACN + 4 mL de amostra + 1g de NaCl; D- 4 mL de ACN+ 2 mL de amostra + 1g de NaCl; E- 2 mL de ACN + 4 mL de amostra; F- 2 mL de ACN + 4 mL de amostra + 1g de NaCl; G- 4 mL de solvente (3,25 mL de ACN + 0,75 de acetato) + 4 mL de amostra; H- 4 mL de solventes (3,25 mL de ACN + 0,75 de acetato) + 4 mL de amostra + 1g de NaCl; I- 2 mL (1,6 mL de ACN + 0,4 de acetato) + 4 mL de amostra.

Figura 3. Resultados da análise de LLE/LTP em diferentes condições de acordo de acordo com a intensidade de área.



Seguindo com análise optou-se por modificar a proporção (SOL:AM) reduzindo dessa vez a quantidade de solvente na extração, mas mantendo as variações da polaridade e força iônica, ensaios E, F, I e J. Destes ensaios os dois que utilizavam sal foram desfavorecidos, sendo que o ensaio J, que consistia na utilização de 2 mL de uma mistura de solventes (1,6 mL de Acetonitrila + 0,4 de acetato) com 4 mL de amostra e 1g de sal, formou uma emulsão durante a extração e não ocorreu o congelamento e separação de fases. Portanto, não foi obtido extrato, impossibilitando sua análise. Os ensaios em estudo restantes (E e I), os dois que demonstraram que a variação da polaridade da FA, com a adição de ACT, desfavoreceu a extração, reduzindo pela metade o número de compostos obtidos. Sendo assim, a condição E (2 mL de ACN + 4 mL de amostra) se destacou dentre as outras, sendo capaz de extrair 26 compostos dos grupos álcoois, ésteres e aromáticos da cerveja.

Esse resultado demonstrou que único fator que realmente influencia no número de analitos extraídos por LLE/LTP em cerveja é a proporção SOL:AM. Sendo que, quanto menor a proporção de solvente com relação ao volume de amostra, mas eficiente à extração. Provavelmente, isso ocorre, pois a redução do volume de solvente extrator causa uma maior concentração dos analitos em acetonitrila. (SKOOG et al., 2014)

É importante ressaltar que utilizando a LLE/LTP-GC-MS foi possível identificar um total de 32 compostos, considerando todas as substâncias obtidas nas 10 condições estudadas. Destas 26 estão presentes na condição selecionada para análise das amostras de cerveja do presente estudo. Estas substâncias complementam o grupo já encontrado com a HS-SPME, enriquecendo o perfil de substâncias características da cerveja com compostos de baixa volatilidade e enaltecendo o valor dessa técnica para o presente estudo. Mesmo com a viabilidade da LLE/LTP de maneira isolada para a extração de compostos voláteis e semi-voláteis da cerveja, essa técnica não possui um fator de enriquecimento muito alto (proporção 1:2 solvente:amostra). Uma tentativa para melhorar o fator de enriquecimento e extrair novos compostos, seria hifenar essa técnica com uma que empregue pequenos volumes de solvente extrator, como a DLLME. A técnica DLLME já foi hifenada, com sucesso, com a extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura para determinação de resíduos de agrotóxicos em solos. (NORONHA, 2014) A hifenação das técnicas minimiza suas desvantagens, sendo assim, a DLLME proporciona a

concentração dos compostos e a LLE/LTP promove o *clean-up* da amostra, possibilitando o uso da DLLME. Assim, a LLE/LTP-DLLME poderia ser de grande valia para esse estudo.

3.4. Extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura hifenada com a microextração líquido-líquido dispersiva (LLE/LTP-DLLME)

Nesse estudo aplicou-se a DLLME nos extratos obtidos em todos os 10 ensaios realizados para a LLE/LTP (ensaios de A-J). Para isso, a fase orgânica da LLE/LTP (acetonitrila) foi adicionada a 5 mL de água e utilizada como solvente dispersor. Após isso, foi feita a extração dos analitos com a adição do solvente extrator (tolueno). A Tabela 6 e a Figura 2 contém todos os compostos que foram identificados utilizando o método de extração LLE/LTP-DLLME e análise por GC-MS realizada em modo *scan*.

Tabela 6. Tabela dos resultados da análise de LLE/LTP em diferentes condições hifenada com a DLLME de acordo com o tempo de retenção e a média das áreas dos compostos

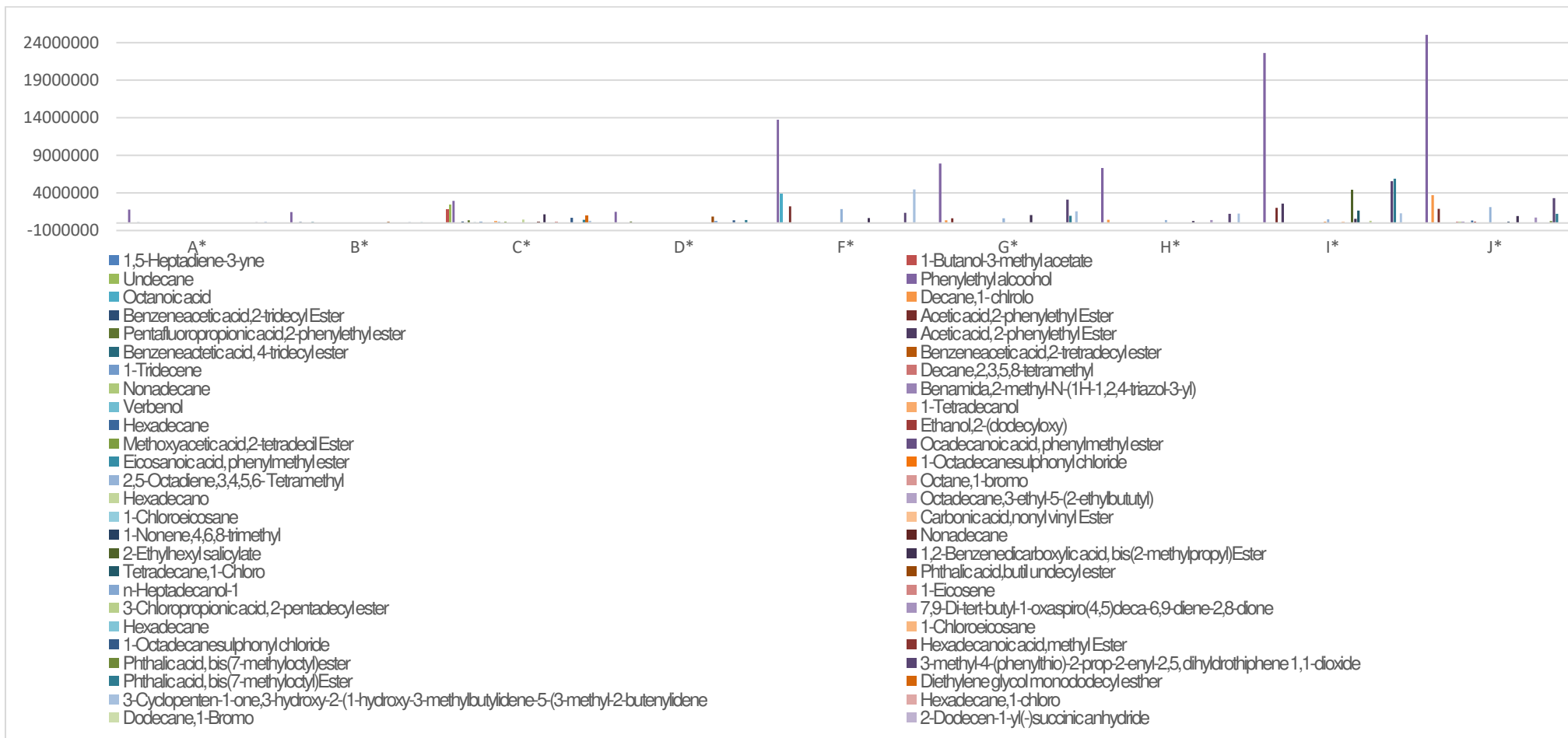
Composto	A*	B*	C*	D*	F*	G*	H*	I*
1,5-Heptadieno-3-ino								
1-butanol-3-metil acetato			X					
Undecano			X					
Álcool feniletílico	X	X	X	X	X	X	X	X
Ácido octanóico					X			
Decano, 1- clorolo						X	X	
Ácido benzenoacético, 2-tridecil Éster	X	X	X					
Ácido acético, éster 2-feniletílico					X	X		X
Ácido pentafluoropropiônico, éster 2-feniletílico			X	X				
Ácido acético, éster 2-feniletílico			X					X
Ácido benzenoacético, éster 4-tridecil	X	X	X					
Ácido benzenoacético, éster 2-tetradecil			X					
1-Trideceno			X					
Decano,2,3,5,8-tetrametil								
Nonadecano								
Benamida,2-metil-N-(1H-1,2,4-triazol-3-il)								

Verbenol						
1-Tetradecanol						X
Hexadecano						X
Etanol,2-(dodeciloxi)						
Ácido metoxiacético, éster de 2-tetradecil						X
Ácido oadecanóico, éster fenilmetílico						X
Ácido eicosanóico, éster fenilmetílico						X
Cloreto de 1-octadecanossulfonil						X
2,5-Octadieno,3,4,5,6-Tetrametil				X	X	X
Octano, 1-bromo						X
Hexadecano	X					X
Octadecano,3-etil-5-(2-etilbutil)						X
1-Cloroeicosano				X		X
Ácido carbônico, éster de nonil vinil						X
1-Noneno,4,6,8-trimetil						
Nonadecano						X
2-Etilhexil salicilato						X
Ácido 1,2-benzenodicarboxílico, bis(2-metilpropil) Éster	X			X	X	X
Tetradecano, 1-Cloro						X
Ácido ftálico, butil undecil éster	X	X		X		X

n-Heptadecanol-1				X				
1-Eicoseno			X					
3-ácido cloropropiônico, 2-pentadecil éster				X				X
7,9-Di-terc-butil-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-dieno-2,8-diona							X	
Hexadecano								
1-Cloroeicosano			X					
Cloreto de 1-octadecanossulfonil	X	X	X	X				
Ácido hexadecanóico, éster metílico								
Ácido ftálico, bis(7-metiloctil)éster							X	
3-metil-4-(feniltio)-2-prop-2-enil-2,5, diidrotifeno 1,1-dióxido	X	X			X	X	X	X
Ácido ftálico, bis(7-metiloctil)Éster		X	X	X		X		X
Éster de monododecil dietilenoglicol			X					
3-Ciclopenten-1-ona,3-hidroxi-2-(1-hidroxi-3-metilbutilideno-5-(3-metil-2-butenilideno	X		X		X	X	X	X
Hexadecano, 1-cloro			X					
Dodecano, 1-Bromo			X					
anidrido 2-dodecen-1-il(-)succínico			X					
Total de Compostos encontrados	9	7	30	7	8	8	8	17

Legenda: A* - 4 mL de ACN + 4 mL de amostra; B* - 4 mL de ACN + 2 mL de amostra; C* - 4 mL de ACN com 4 mL de amostra com certa de 1g de sal; D* - 4 mL de ACN + 2 mL de amostra + 1 g de NaCl; F* - 2 mL de ACN + 4 mL de amostra + 1 g de NaCl; G* - 4 mL de solvente (3,25 mL de ACN + 0,75 mL de acetato) + 4 mL de amostra; H* - 4 mL (3,25 mL de ACN + 0,75 de acetato) + 4 mL de amostra + 1 g de NaCl; I* - 2 mL (1,6 mL de ACN + 0,4 de acetato) + 4 mL de amostra, J* - 2 mL (1,6 mL de ACN + 0,4 de acetato) + 4 mL de amostra.

Figura 4. Tabela dos resultados da análise de LLE/LTP em diferentes condições hifenada com a DLLME de acordo com o tempo de retenção e a média das áreas dos compostos



Nota-se que graças ao fator de enriquecimento da DLLME foi possível detectar um maior número de compostos (53) na hifenação quando comparada a LLE/LTP isolada, onde foram detectados um total de 32. Sendo que estes valores levam em conta a soma de substâncias encontradas em todos os ensaios (A-J) e que os compostos identificados pelo espectrômetro de massa (primeiro com probabilidade acima de 70%) para a LLE/LTP-DLLME não foram os mesmos identificados quando somente a LLE/PBT foi usada. Isto pode estar relacionado com a polaridade do tolueno, usado como solvente extrator na LLE/LTP-DLLME. Uma vez que o tolueno é um solvente apolar, os compostos apolares foram preferencialmente extraídos pela técnica hifenada (LLE/LTP-DLLME), que favoreceu a pré-concentração destes. Provavelmente, estes compostos estavam na fase orgânica (ACN) da LLE/LTP em concentrações inferiores a sensibilidade do GC-MS. Esses compostos, mais polares, tenderam a permanecerem na parte aquosa da mistura, uma vez que na DLLME há o uso de um volume de 5 mL de água, não sendo extraídos pelo tolueno e identificados.

Com isso pode-se assim dizer que o método hifenado possibilitou a identificação de outros tipos de compostos, sendo considerado outra alternativa de método de extração. E, provavelmente utilizando outro tipo de solvente extrator pode haver uma mudança no perfil das substâncias recuperadas.

É importante ressaltar que não foi possível obter respostas para os ensaios E* e J*. Uma vez que no ensaio J da LLE/LTP não houve separação de fazer e no teste E* da hifenação houve à formação de emulsão, o que impediu a sua análise. Por isso, estes estão ausentes da tabela 6 e na Figura 2. Outro problema observado pelo uso de tolueno na DLLME, mesmo sendo um solvente muito utilizado nesse tipo técnica de extração (NORONHA, 2014; PIMENTA et al., 2017) foi observado uma saturação do detector no início da análise cromatográfica, mesmo sendo usado um tempo de corte de 5 min, como recomendado. Isto pode estar relacionado à temperatura inicial da coluna (31 °C), que é adequada para recuperar compostos voláteis, mas deve ser reavaliada não prejudicar o funcionamento do equipamento diminuindo a vida útil do mesmo. Solventes como Clorofórmio, diclometano, hexano e n-hexano foram substituídos e testados, mesmo assim, o problema de saturação persistiu nas análises. Esse fator não impede que o método possa ser utilizado analisado em equipamentos acoplados a outros tipos de detectores que não haja esse tipo de saturação.

Avaliando os resultados apresentados na Tabela 6 e Figura 2, observa-se também que o ensaio C* (4 mL de acetonitrila, 4 mL de amostra + sal), se destacou ao possibilitar a extração de 30 compostos. Este resultado foi surpreendente, pois o extrato do ensaio C, obtido na LLE/LTP foi um dos que possuía menor número de compostos extraído. Nele utilizava-se uma maior quantidade de solvente extrator (ACN) na proporção (SOL:AM) e havia a adição de sal, mostrando que a adição de sal ajuda na extração de compostos. No entanto, avaliando este resultado com um novo olhar, pode-se inferir que como etapa de *clean-up*, o ensaio C da LLE/LTP fez o seu papel com maestria. Ele removeu da amostra substâncias que interferiam, impossibilitando a DLLME de maneira direta, e ainda separou os constituintes da cerveja entre a fase aquosa e orgânica da etapa de extração permitindo recuperar e concentrar substâncias antes não analisadas. Provavelmente, mesmo que não visível na análise da LLE/LTP a adição do sal no ensaio E* promoveu um efeito *salting out* nas moléculas maiores com caráter mais apolar, extraídas pela LLE/LTP-DLLME. E, o maior volume de ACN, possibilitou a extração de uma maior quantidade de substâncias, que depois foram concentrados no pequeno volume de solvente extrator presentes na DLLME.

Diante dos resultados encontrados e levando em conta o objetivo principal do presente trabalho, entende-se que para garantir um perfil de compostos presentes na cerveja mais completo o ensaio de LLE/LTP-DLLME selecionado deve ser o C*. Nele, foi possível observar substâncias menos voláteis, com maior cadeia carbônica e que são de grupos químicos não identificados nas outras duas técnicas como aromáticos, hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos, entre outros.

3.5. Perfil de compostos voláteis e semi-voláteis na cerveja

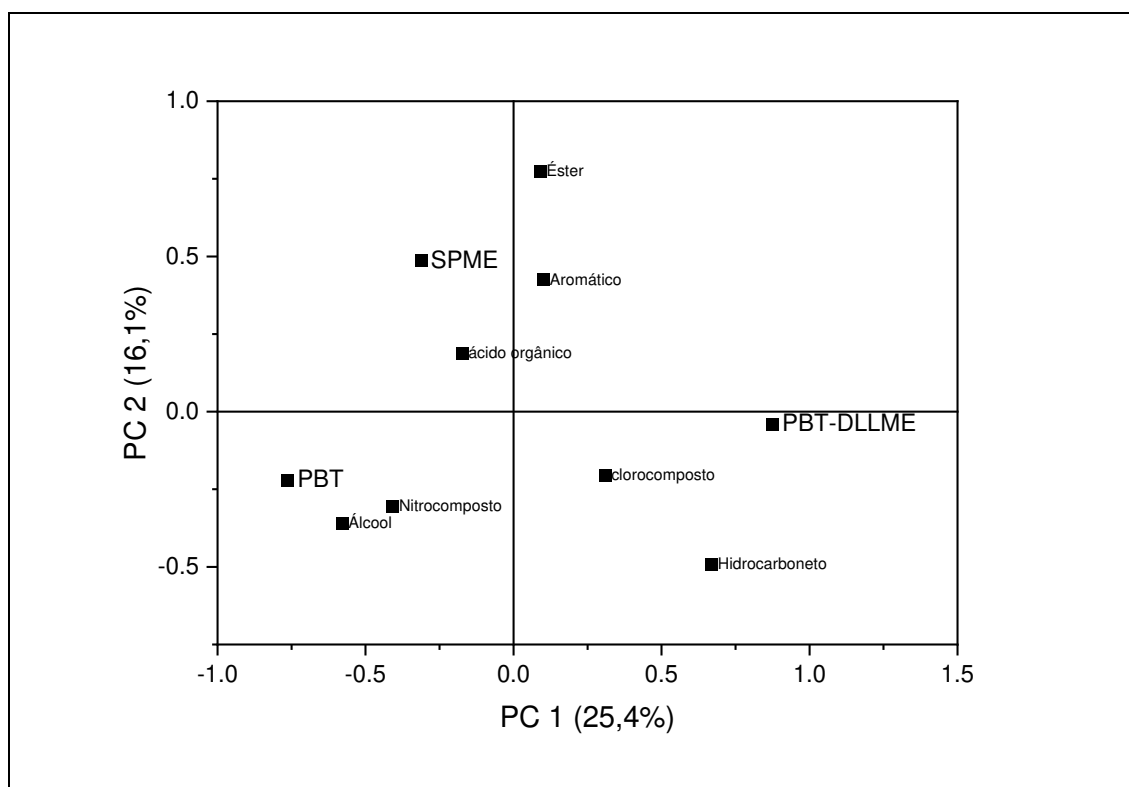
Levando em consideração otimização de cada técnica de extração otimizada, conclui-se que para obter um resultado satisfatório, com maior número de compostos detectados deve-se selecionar os ensaios com mais substâncias extraídas. Sendo assim, as amostras devem ser submetidas ao conjunto das 3 técnicas (HS-SPME, LLE/LTP e LLE/LTP-DLLME). A HS-SPME selecionada utiliza a fibra DVB-CAR-PDMS e 20 °C de incubação por 30 min, LLE/LTP usa com 2 mL acetonitrila e 4 mL de amostras e a hifenação LLE/LTP-DLLME, 4 mL de ACN com 4 mL de amostra com

cerca de 1g de sal. Esse conjunto de técnicas permite a análise de 69 compostos, dos seguintes grupos: Éster, aromático, ácido orgânico, cloro composto, hidrocarboneto, nitro composto e álcool.

Foi construída uma matriz formada por todos compostos identificados em todos os ensaios, discriminados em termos funções químicas presentes assim como em quais tipos de preparo de amostra (HS-SPME, PBT e PBT-DLLME) esses compostos foram identificados.

A análise de componentes principais dessa matriz levou à explicação de 25,4% da variância pelo PC1 e 16,1% pelo PC2. O gráfico de *loading* desses componentes é apresentado na Figura 3.

Figura 5. Gráfico de loading com a discriminação dos compostos presentes na cerveja de acordo com a técnica de extração utilizada.



Observa-se que o primeiro componente (PC1) permite discriminar o PBT-DLLME (valores positivos) do SPME (valores mais próximos de zero) e PBT (valores mais negativos). Além disso, associa os compostos com funções hidrocarboneto (cadeias longas) e contendo átomos de cloro com a PBT-DLLME. Compostos com nitrogênio e grupos álcoois forma relacionados com PBT. A segunda componente

(PC2) distingue a SPME (valores positivos) das outras, além de associar compostos com funções éster, aromáticos e ácidos como sendo mais extraídos por essa técnica de preparo da amostra.

Mesmo assim, vale a pena ressaltar que caso necessário analisar ou quantificar apenas um grupo de composto ou uma substância pode selecionar apenas uma das técnicas e otimizá-la a fim de potencializar sua resposta, tornando-a mais seletiva.

4. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o estudo da HS-SPME, LLE/LTP e LLE/LTP-DLLME utilizando o GC-MS como método de análise identificou diversos compostos voláteis e semivoláteis em amostras de cerveja, sendo que os dois últimos identificaram compostos que até então não havia sido identificado em amostras de cerveja. Esse estudo de otimização possibilitou a obtenção de um melhor perfil de compostos voláteis e semivoláteis da cerveja, alcançando o maior número de compostos possível, bem como identificando a técnica ideal de acordo com o composto a ser analisado.

5. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. A novel dispersive liquid e liquid microextraction (DLLME) gas chromatography- mass spectrometry (GC e MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. **Food Control**, v. 25, n. 1, p. 380–388, 2012.

ALVES, V. et al. Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. **Food Chemistry**, v. 326, n. November 2019, p. 126856, 2020.

ATTCHELOUWA, C. K. et al. Characterisation of volatile compounds associated to sensory changes during the storage of traditional sorghum beer by HS-GC / FID and SPME-GC / MS. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 2, n. November 2019, 2020.

CHARRY-PARRA, G.; DEJESUS-ECHEVARRIA, M.; PEREZ, F. J. Beer Volatile Analysis : Optimization of HS / SPME Coupled to GC / MS / FID. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. C205–C211, 2011.

CORTACERO-RAMÍREZ, S. et al. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 440–455, 2003.

DACK, R. E. et al. The effect of Maillard reaction products and yeast strain on the synthesis of key higher alcohols and esters in beer fermentations. **Food Chemistry**, v. 232, p. 595–601, 2017.

DE PINHO, G. P. et al. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, n. 10, p. 1307–1311, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.03.006>>.

DIAS, A. N. et al. Cork as a new (green) coating for solid-phase microextraction : Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by gas chromatography – mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 772, p. 33–39, 2013.

FARAJZADEH, M. A. et al. Original Paper Dispersive liquid – liquid microextraction using extraction solvent lighter than water. p. 3191–3200, 2009.

FERREIRA, I. M. et al. Impact of temperature during beer storage on beer chemical profile. **Lwt**, v. 154, n. September 2021, 2022.

FONTANA, A. R.; TORO, M. M. de; ALTAMIRANO, J. C. One-Step Derivatization and Preconcentration Microextraction Technique for Determination of Bisphenol A in Beverage Samples by Gas Chromatography À Mass Spectrometry. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, p. 3559–3565, 2011.

GIANNETTI, V. et al. Flavour component analysis by HS-SPME/GC–MS and chemometric modeling to characterize Pilsner-style Lager craft beers.

Microchemical Journal, v. 149, n. March, p. 103991, 2019.

GOULART, S. M. et al. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–1323, 2008.

HERRINGTON, J. S. et al. Hunting Molecules in Complex Matrices with SPME Arrows : A Review. **Separations**, v. 7, n. 12, p. 2–20, 2020.

HUMIA, B. V. et al. Beer Molecules and Its Sensory and Biological Properties : A Review. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1568, 2019.

JI, X. Comparative investigation of volatile components and bioactive compounds in beers by multivariate analysis. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 36, n. 3, p. 374–383, 2021.

JIAO, J. et al. Study of Chromatographic Fingerprint of the Flavor in Beer by HS-SPME-GC. **Analytical Letters**, v. 44, n. 4, p. 648–655, 2011.

JING, X. et al. Popping candy-assisted dispersive liquid – liquid microextraction for enantioselective determination of prothioconazole and its chiral metabolite in water , beer , Baijiu , and vinegar samples by HPLC. **Food Chemistry**, v. 348, n. August 2020, p. 129147, 2021.

LEHNHARDT, F.; GASTL, M.; BECKER, T. Forced into aging: Analytical prediction of the flavor-stability of lager beer. A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2642–2653, 2019.

NORONHA, L. M. S. de. **HIFENAÇÃO DAS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO COM LÍQUIDO DISPERSIVO COM SOLVENTE DE BAIXA DENSIDADE (LDS / DLLME)**. 2014. 104 f. Universidade Federal de Viçosa, 2014.

PARENTE, C. et al. Inverse dispersive liquid-liquid microextraction (I-DLLME) for the simultaneous and green preconcentration of DEET and permethrin from freshwater. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 27, n. November 2021, p. 100669, 2022.

PIMENTA, G. G. et al. DLLME-GC/ECD Method for the Residual Analysis of Parathion-Methyl and its Application in the Study of the UV-Photodegradation Process. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 28, n. 11, p. 2045–2053, 2017.

PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; SANTOS, H. M. L. M. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1121, p. 145–153, 2006.

PIORNOS, J. A. et al. Orthonasal and retronasal detection thresholds of 26 aroma compounds in a model alcohol-free beer : Effect of threshold calculation method. **Food Research International**, v. 123, n. April, p. 317–326, 2019.

- QUEIROZ, M. E. C. Microextração em fase sólida para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica Microextração**, v. 1, n. 3, p. 11–19, 2009.
- REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid – liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342–2357, 2010.
- REZAEI, S. et al. Solvent and Solvent to Sample Ratio as Main Parameters in the Microwave-assisted Extraction of Polyphenolic Compounds from Apple Pomace. **Food Sci. Biotechnol.**, v. 22, n. 5, p. 1269–1274, 2013.
- RODRIGUES, F.; CALDEIRA, M.; CAMARA, J. S. Development of a dynamic headspace solid-phase microextraction procedure coupled to GC – qMSD for. **Analytica Chimica Acta**, v. 609, p. 82–104, 2008.
- RODRIGUEZ-BENCOMO, J. J. et al. Optimization of a HS-SPME-GC-MS Procedure for Beer Volatile Profiling Using Response Surface Methodology : Application to Follow Aroma Stability of Beers Under Different Storage Conditions. **Food Anal. Methods**, v. 5, p. 1386–1397, 2012.
- RODRÍGUEZ-CÁCERES, M. I. et al. Dispersive liquid-liquid microextraction for a rapid determination of glyoxal in alcoholic beverages. **Talanta**, v. 168, n. March, p. 100–104, 2017.
- SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 9ª edição ed. São Paulo: Cengage, 2014.
- SUTÉRIO, N. G. et al. Use of a Natural Sorbent as Alternative Solid-Phase Microextraction Coating for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Water Samples by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. v. 29, n. 11, p. 2417–2425, 2018.
- VIEIRA, A. C. et al. Multi-target optimization of solid phase microextraction to analyse key flavour compounds in wort and beer. **Food Chemistry**, v. 317, n. February, p. 126466, 2020.
- VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. de. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535–540, 2007.
- XIONG, J.; HU, B. Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid – liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1193, p. 7–18, 2008.
- XU, X. et al. Talanta Determination of formaldehyde in beverages using microwave-assisted derivatization and ionic liquid-based dispersive liquid – liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. **Talanta**, v. 85, p. 2632–2638,

2011.

ZANELLA, D. et al. Comparison of headspace solid-phase microextraction high capacity fiber coatings based on dual mass spectrometric and broadband vacuum ultraviolet absorption detection for untargeted analysis of beer volatiles using gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 1141, p. 91–99, 2021.

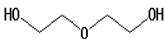
CAPÍTULO 3. PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA UM MÉTODO DE TRIAGEM SIMPLES PARA DETERMINAÇÃO DE DIETILENOGLICOL, EM CERVEJA, POR CROMATOGRAFIA GASOSA

1. INTRODUÇÃO

A cerveja, juntamente com o vinho, são as bebidas fermentadas mais consumidas no mundo e possuem uma alta taxa de produção. (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018) Considerando o crescimento econômico e a importância do mercado, os empreendedores têm que estar atentos à qualidade do produto durante a produção, visando à valorização da marca. (GARAVAGLIA; SWINNEN, 2018)

A refrigeração utilizada na fabricação de cerveja é um fator de relevância no processo cervejeiro, tanto por razões físico-químicas do processo, como para o controle da atividade biológica desenvolvida na fermentação. (SANTOS; RIBEIRO, 2005) No processo de refrigeração é comum o uso de água, etanol, propilenoglicol e glicerol, substâncias consideradas adequadas para serem utilizadas dentro de uma serpentina no interior das dornas que facilitam esse processo de resfriamento. (SANTOS; RIBEIRO, 2005) O dietilenoglicol (DEG – Tabela 1), por apresentar propriedades físico-químicas semelhantes aos glicóis e ser mais barato, têm sido usado de forma inadequada na serpentina, no entanto, não são seguros. (CALDEIRA et al., 2021)

Tabela 1- Dietilenoglicol: Estrutura e propriedades físico-químicas

Composto	Molecular formula	Chemical structure	Chemical group	Molar mass (g mol ⁻¹)	Ponto de ebulição	Densidade
DEG	C ₄ H ₁₀ O ₃		Glicol	106,12 g mol ⁻¹	242-247 °C	1.18 g/cm ³

No Brasil, recentemente foi relatado um eventual acidente na fabricação da cerveja onde o DEG foi utilizado no processo de resfriamento e provocou a intoxicação e morte de dezenas de pessoas. (GOULART, C. O. L. et al., 2022) Caldeira e colaboradores analisaram amostras de cerveja de diversas marcas, dentre elas as cervejas consideradas contaminadas identificando o composto DEG em 8% das amostras avaliadas. Na ocasião houve o contato do fluido de resfriamento com a cerveja, devido ao vazamento nessas serpentinas. A ingestão oral aguda e repetitiva

de DEG resulta em efeitos adversos significativos à saúde dos consumidores, incluindo toxicidade renal e letalidade. Fatos como esse, que relatam o uso inadequado dessa substância, mostram que o controle de qualidade relacionado à presença do DEG em amostras de cerveja é de suma importância. Além disso, estudos relacionados a análise desse contaminante em cerveja são escassos. Portanto, a necessidade do desenvolvimento de técnicas simples, eficientes e de baixo custo que permitam fazer uma triagem para verificação de contaminação de cervejas com DEG se mostram necessários.

Para determinar e quantificar compostos presentes em amostras de cerveja, uma etapa de extração dos analitos deve ser realizada. (DE PINHO et al., 2010) Entre as técnicas de extração comumente usadas na análise de cerveja, estão a extração em fase sólida (ZHENG et al., 2017), a microextração em fase sólida (VIEIRA, A. C. et al., 2020; ZANELLA et al., 2021) e o método denominado QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe). (GONZÁLEZ-JARTÍN et al., 2019; LAGO et al., 2021) A extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) tem se mostrado uma ótima ferramenta para extração de diversos analitos em diferentes matrizes como água, (VIEIRA.; NEVES; QUEIROZ, 2007) leite, (GOULART, S. M. et al., 2008) mel (DE PINHO et al., 2010) e urina. (SILVA et al., 2022) Paula *et al* (DE PAULA et al., 2018) empregaram com sucesso, a LLE/LTP e a espectrometria de massa por *spray* em papel (*paper spray mass spectrometry* - PS-MS) para determinar benzodiazepínicos em diversas bebidas, entre elas, a cerveja. A LLE/LTP se baseia na partição dos analitos entre a fase aquosa e orgânica devido à redução da temperatura. Uma das vantagens da técnica é que por se tratar de uma extração em fase única. Nesse tipo de extração, os analitos são transferidos para a fase orgânica após rompimento do equilíbrio da mistura homogênea. Essa, que se encontra congelada, é facilmente removida. De forma geral, esse processo de extração não necessita de outras etapas de purificação. (DE PINHO, et al., 2010)

As etapas de identificação e quantificação do DEG são realizadas por cromatografia gasosa (GC) (CALDEIRA et al., 2021; HOLLOWAY et al., 2010; RAHIM et al., 2011) e cromatografia líquida (CAMPONE et al., 2020; RAUSCH; BROCKMEYER; SCHWERDTLE, 2021). O cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização em chama (GC/FID) pode ser considerado um método robusto e sensível o suficiente para quantificar o DEG em amostras de cerveja, (HOLLOWAY

et al., 2010) além de ser uma técnica simples, confiável, versátil e de fácil operação, (HAGE, 2018) enquanto o GC-MS, apesar de ser de alto custo, é um método poderoso para a identificação dos compostos, já que a razão m/z seleciona e monitora os íons durante o processo cromatográfico. (SKOOG et al., 2014)

No presente estudo, um método simples e de baixo custo foi otimizado e validado para a determinação do DEG, em cerveja. Este método foi posteriormente aplicado em amostras de cerveja comercializadas no Brasil.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes e soluções

Padrões de DEG e de pentanol, foram adquiridos da Carlo Erba (São Paulo, Brasil) e da Sigma Aldrich (EUA) respectivamente. Os solventes acetonitrila (ACN) (99.5% - grau HPLC) e acetato de etila (ACT) (99.5%) usados nas extrações foram adquiridos da Sigma-Aldrich, (USA, CAS 75-05-8) e da VETEC (Brasil, CAS 141-78-6) respectivamente. Sais como sulfato de sódio (VETEC, Brasil, CAS 7757-82-6), cloreto de sódio (Êxodo Científica, Brasil, CAS 7647-14-5) e tiosulfato de sódio (Neon, Brasil, CAS 10102-17-7) foram também utilizados nesse experimento.

As soluções estoque dos padrões de DEG e pentanol, usado como padrão interno (PI), foram preparadas em ACN nas concentrações de 500 mg L⁻¹ e 5.000 mg L⁻¹ respectivamente. As soluções de trabalho foram preparadas diluindo quantidades apropriadas das soluções estoque em ACN e foram armazenadas em *freezer* a -20 ± 2 ° C em frascos de vidro âmbar.

2.2. Amostras

Amostras de cerveja, de uma determinada marca, isentas de DEG, foram adquiridas em supermercados de Viçosa e utilizadas nas etapas de otimização e validação do método. Testes preliminares confirmaram a ausência de DEG nessas amostras. O método otimizado e validado foi aplicado em 28 amostras autênticas de cerveja de diferentes marcas e estilos adquiridas no comércio local de Viçosa-MG e região. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As amostras foram acondicionadas em geladeira (3 ± 1 ° C) até o momento da análise.

2.3. Instrumentos e aparelhos

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás (GC - Shimadzu, modelo GC 2014 Plus, Japão) equipado com um amostrador automático (Shimadzu, modelo, AOC-20i Plus, Japão) e um detector de ionização em chama (FID). A identificação do DEG foi confirmada em um cromatógrafo a gás acoplado a

um espectrômetro de massas (Shimadzu, modelo GCMS-QP2020, Japão) e equipado com um amostrador automático (Shimadzu, modelo, AOC-20i, Japão).

Outros equipamentos usados foram: balança analítica (Modelo AX200, Shimadzu, Japão), agitador vórtex (Certomat® MV – B. Braun Biotech International) e geladeira/ *freezer* (Consul, modelo 280, São Paulo, Brazil).

2.4. Condições cromatográficas

As condições empregadas no cromatógrafo a gás equipado com um sistema injetor split / splitless e um detector de ionização de chama usado para separação e determinação do DEG nas amostras de cerveja são descritas a seguir. O Nitrogênio (99.999%, White Martins, Brasil) foi usado como gás de arraste. A temperatura do injetor e do detector foram mantidas a 250 °C. Um volume de 1 µL foi injetado no modo splitless, com amostragem de 60 s. A separação foi realizada em uma coluna capilar NA-Wax (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm de espessura do filme). A programação de temperatura da coluna foi otimizada pela injeção de soluções padrão do DEG e do PI. A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: temperatura inicial 75 °C (mantida por 2 min), seguida por um aquecimento até 130 °C a uma taxa de 15 °C / min, sendo mantida a 130 °C por 5 minutos, depois foi aquecida de 130 °C até 230 °C a uma taxa de 20 °C / min, sendo mantida nesta temperatura por 5 min. Nessas condições o tempo total de corrida foi de 20.67 min por amostra.

Para a confirmação das amostras de cervejas contaminadas com DEG foi utilizado um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa. O Hélio (99.999%, White Martins, Brasil) foi usado como gás de arraste. A temperatura do injetor e do detector foram mantidas a 250 °C. Um volume de 1 µL foi injetado no modo splitless com um tempo de amostragem de 60 s. A separação foi realizada em uma coluna capilar NA-Wax (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm de espessura do filme). A temperatura do forno foi programada da seguinte forma: temperatura inicial 75 °C (mantida por 5 min), seguida por um aquecimento até 130 °C a uma taxa de 20 °C / min, sendo mantida a 130 °C por 5 minutos, depois foi aquecida de 130 °C até 230 °C a uma taxa de 20 °C / min e mantida a 230 °C por 15 min, sendo o tempo total de corrida de 32,75 min por amostra. Os dados MS foram adquiridos no modo SCAN usando ionização eletrônica com uma energia eletrônica de 70 eV. Um tempo de corte

de 5,0 min foi definido para evitar danos ao instrumento. As temperaturas da interface do detector foram fixadas em 280 °C, e a fonte de ionização em 250 °C.

O DEG e o PI foram identificados comparando-se os tempos de retenção dos picos obtidos para os extratos das amostras com os dos padrões e no caso do GC-MS a confirmação também foi averiguação pelo espectro de massa. A quantificação foi feita pelo método de superposição de matriz, com fortificação de amostras de cerveja livres dos compostos usando cinco concentrações do DEG na faixa de 10 a 50 mg L⁻¹ e com o PI na concentração de 50 mg L⁻¹.

As amostras eram submetidas ao método de extração e analisadas por GC/FID e por GC-MS.

2.5. Otimização da extração líquido-líquido com partição a baixa temperatura (LLE/LTP)

A técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP), para análise de DEG em amostras de cerveja, foi otimizada. Nesta técnica, 4.0 mL da amostra de cerveja foram colocados em contato com a solução extratora. Após agitação em vórtex, por 1 min, a mistura foi resfriada por 6 horas em *freezer* a -20 °C para separação das fases pelo congelamento/resfriamento da fase aquosa. O extrato orgânico foi coletado, transferido para um vial e analisado por GC-FID.

A otimização do método foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa foi avaliada, univariadamente, o uso de sais para promover o efeito salting-out. Depois de estabelecida a melhor condição de extração com o uso de sais, ao método foi aplicado um planejamento fatorial 2² envolvendo a proporção entre os solventes extratores, acetonitrila e acetato de etila (ACN:ACT).

2.6. Análise univariada usando sais na extração do DEG em amostras de cerveja

O efeito da adição de sais na extração DEG foi avaliada variando os tipos de sais e as concentrações dos mesmos na eficiência da extração pela técnica LLE/LTP. Amostras livres das soluções padrão e sais e amostras fortificadas sem adição de sal foram usadas para comparação (ensaios A) (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação dos ensaios (A a G) em função da adição de diferentes sais em diferentes concentrações às amostras de cervejas.

Ensaio	Sal utilizado	Conc. do sal (10⁶ mg L⁻¹)
A	NA	NA
B	Na ₂ SO ₄	0.2
C	Na ₂ SO ₄	0.6
D	NaCl	0.2
E	NaCl	0.6
F	Na ₂ S ₂ O ₃	0.2
G	Na ₂ S ₂ O ₃	0.6

NA- Não aplicável.

As melhores condições, ou seja, maior percentagem de extração de DEG em amostras de cerveja, foram utilizadas nos ensaios posteriores.

2.7. Análise multivariada avaliando os efeitos do sal e do solvente extrator (ACN:ACT) na extração do DEG em amostras de cerveja

Um planejamento fatorial 2² foi aplicado para avaliação dos efeitos na extração do DEG em amostras de cerveja pela adição de sal e pela alteração da polaridade do solvente extrator. As análises foram realizadas em triplicatas e os dados do planejamento são mostrados na Tabela 3. As melhores condições dos planejamentos foram avaliadas em função das respostas cromatográficas (áreas) obtidas em cada ensaio.

Tabela 3. Planejamento fatorial 2², realizado em triplicata para estabelecer as melhores condições para extração de DEG de amostras de cerveja

Ensaio	Fatores (Valores Codificados)		Fatores (Valores Reais)	
	SE	S	SE	S
1	+	-	ACN	S/SAL
2	-	-	ACN:ACT	S/SAL
3	+	+	ACN	SAL
4	-	+	ACN:ACT	SAL
5	+	-	ACN	S/SAL
6	-	-	ACN:ACT	S/SAL
7	+	+	ACN	SAL
8	-	+	ACN:ACT	SAL
9	+	-	ACN	S/SAL
10	-	-	ACN:ACT	S/SAL
11	+	+	ACN	SAL
12	-	+	ACN:ACT	SAL

Legenda: SE- Solução extratora; S-Sal; ACN- Acetonitrila; ACT - Acetato de etila; ACN/ACE = mistura dos dois solventes na proporção 3.25:0.75 (v/v). The data correspond to the (-) lower value and (+) upper value levels of factorial design.

2.8. Validação

A validação do método LLE/LTP-GC/FID para determinação de DEG em amostras de cerveja foi efetuada para os seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, efeito de matriz, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. Esses parâmetros foram estimados de acordo com o protocolo de validação especificado nas diretrizes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MAPA, 2015), uma vez que este é o órgão responsável pelo controle de qualidade e segurança das bebidas no Brasil e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA (ANVISA, 2017).

2.8.1. Seletividade

A seletividade do método LLE/LTP-GC/FID foi avaliada pela comparação dos cromatogramas obtidos da análise do extrato de cerveja livre de DEG e do PI, branco, e do extrato de cerveja fortificado com DEG e com PI.

2.8.2. Efeito de Matriz

O efeito de matriz foi avaliado pela comparação de curvas de calibração obtidas pela injeção de soluções padrão de DEG preparadas em solvente e no extrato da matriz em diferentes concentrações de DEG (10, 20, 30, 35 e 50 mg L⁻¹). Os extratos da matriz foram preparados aplicando-se o procedimento de extração otimizado para as amostras de cerveja isentas do analito conforme descrito anteriormente. O efeito da matriz foi avaliado pela comparação das inclinações e dos interceptos das curvas de calibração preparadas em solvente e nas curvas preparadas no extrato da matriz conforme descrito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (2015). (MAPA, 2015)

2.8.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e quantificação foram estimados pelo método da relação sinal-ruído. A determinação da relação sinal/ruído foi realizada comparando os sinais medidos (área) da amostra em branco com as amostras com baixas concentrações conhecidas do analito, estabelecendo a concentração mínima na qual o analito pode ser detectado ou quantificado. (RIBANI et al., 2004) Para estabelecer o LD e LQ, amostras de cerveja foram fortificadas em concentrações crescentes de DEG (de 0,25 a 50 mg L⁻¹). O limite de detecção foi estimado considerando a relação sinal-ruído de 3:1. O limite de quantificação foi estimado de forma equivalente, mas considerando a relação sinal-ruído de 10:1.

2.8.4. Linearidade do método

A linearidade de resposta do método foi avaliada submetendo-se amostras de cerveja fortificadas com padrões de DEG, em uma faixa de trabalho que variou de 10 a 50 mg L⁻¹ e com o PI na concentração de 50 mg L⁻¹, à técnica de LLE/LTP.

2.8.5. Precisão e Exatidão

A precisão do método LLE/LTP-GC/FID foi estimada, em função da repetibilidade e precisão intermediária, enquanto que a exatidão foi estimada pelas taxas de recuperação. (ANVISA, 2017) Uma vez que não existe um limite máximo permitido para o DEG em cervejas, foram utilizados valores genéricos para avaliar a exatidão e precisão do método. (MAPA, 2015)

Para avaliar a repetitividade do método, as amostras foram fortificadas em 3 diferentes concentrações (10, 30 e 50 mg L⁻¹), em triplicata, e submetidas, ao método de extração e análise LLE/LTP-GC/FID. Estas amostras foram analisadas, pelo mesmo analista, no mesmo dia, empregando o mesmo equipamento. Já a precisão intermediária consistiu na avaliação das amostras fortificadas em 3 níveis de concentração (10, 30 e 50 mg L⁻¹) e submetidas ao método em 3 dias distintos e não consecutivos (dias 1, 3 e 5). Essas análises foram feitas pelo mesmo analista, empregando os mesmos equipamentos em dias diferentes.

A precisão do método foi expressa pelo coeficiente de variação (%CV), dado pela Equação 1.

$$\%CV = \frac{(\text{estimativa do desvio padrão das áreas obtidas} \times 100)}{\text{média das áreas obtidas}} \quad (\text{Equação 1})$$

Para avaliar a exatidão, foi realizado um estudo da recuperação. (ANVISA, 2017) Para isso, amostras em branco foram fortificadas e analisadas, em três níveis de concentração (10, 30 e 50 mg L⁻¹) em triplicata. Essas amostras foram submetidas ao método de extração LLE/LTP e analisadas por GC-FID. A exatidão foi avaliada pela porcentagem de recuperação (% R) conforme a equação 2, empregando uma curva analítica preparada nas mesmas condições.

$$\%R = \frac{C_{ex} \times 100}{C_t} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

C_e = média das concentrações relativas obtidas através das equações de reta para o analito;

C_t = Concentração em que as amostras foram fortificadas.

Para os estudos de precisão e exatidão as amostras foram analisadas em triplicatas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

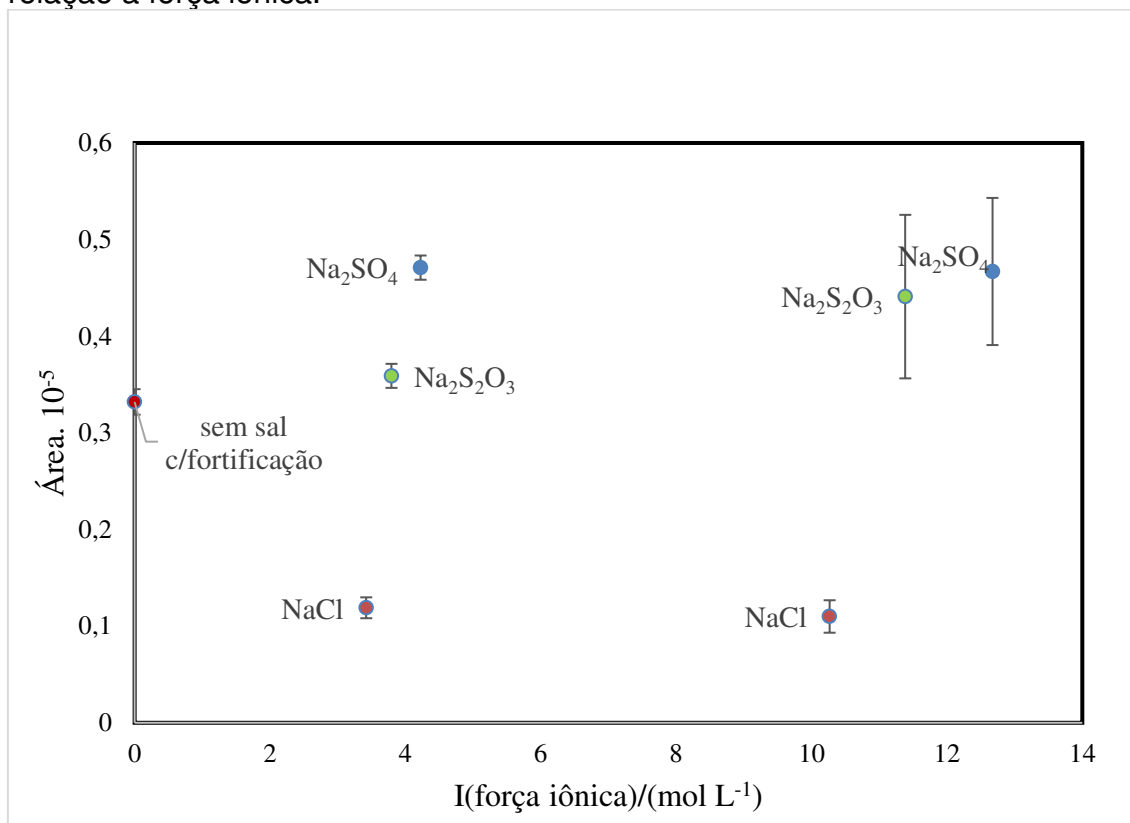
3.1. Otimização da extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP)

A eficiência da extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (LLE/LTP) pode sofrer a influência de alguns fatores como adição de sal ao meio, tipo de sal adicionado, escolha da solução extratora, em função da proporção ideal entre os solventes, entre outros. A escolha correta do melhor conjunto de parâmetros leva à maior sensibilidade e precisão do método. (HELENO et al., 2014)

Inicialmente a eficiência da LLE/LTP foi avaliada, univariadamente, com relação à adição de sal ao sistema. A adição de sal ao meio teve como objetivo aumentar a eficiência de extração do analito, DEG, e avaliar o efeito *salting-out* sobre o sistema. A adição de sal à amostra de cerveja altera as propriedades físico-químicas do sistema formado pela amostra e o solvente extrator, particionando os analitos preferencialmente para a fase orgânica (efeito *salting-out*). (GRECCO et al., 2018) Os resultados sugerem, de acordo com as áreas obtidas, que o sal que proporcionou menor eficiência de extração foi o cloreto de sódio (0.1174×10^5) e o sal ideal para a extração do DEG foi o sulfato de sódio (0.4864×10^5). Uma provável justificativa para o melhor desempenho do sulfato de sódio em relação ao cloreto de sódio pode estar relacionada ao fato do cloreto de sódio não permitir o congelamento completo da fase aquosa, o que poderia potencializar a extração dos analitos para a fase orgânica. O congelamento é uma etapa importante na técnica, uma vez que permite a separação de fases e a limpeza do extrato. (COSTA et al., 2015)

Para entender melhor esse comportamento, avaliou-se os resultados considerando a influência dos íons presentes nos respectivos sais, isto é, em relação à força iônica do meio. Esses resultados são apresentados na Figura 1.

Figura 1. Efeito da adição de sais na extração de DEG em amostras de cerveja em relação à força iônica.



Ao considerar a força iônica (Figura 1) em relação às áreas obtidas nas análises cromatográficas, pode-se dizer que a força iônica influencia significativamente o comportamento da extração do DEG. Para melhor entender esse comportamento os dados estão compilados na Tabela 4.

Tabela 4. Compilação dos dados obtidos na extração de DEG utilizando diferentes sais em diferentes concentrações.

Ensaio	Sal	Conc. (mol/L)	Média da Área.10 ⁻⁵	SD.10 ⁻⁵	%CV	% Efeito da adição do sal
A	S/sal c/fortificação		0,332	0.013	4%	0,0
B	Na ₂ SO ₄	1.41	0.4.71	0.013	2%	41.9
C	Na ₂ SO ₄	4.22	0.467	0.076	16%	40.7
D	NaCl	3.42	0119	0.011	9%	-64.0
E	NaCl	10.27	0.11	0.017	15%	-67.0
F	Na ₂ S ₂ O ₃	1.26	0.359	0.012	3%	8.1
G	Na ₂ S ₂ O ₃	3.79	0.441	0.085	19%	32.9

Legenda: SD- Desvio padrão; CV- Coeficiente de variação.

Para extração do DEG, o efeito negativo, causado pela adição de NaCl, em relação a área sem a presença de sais é bastante acentuado (diminuição média de 66%) (Tabela 4). Na presença de tiosulfato, houve um aumento linear da área com o aumento da concentração do íon como mostra a Equação 3.

$$\hat{A} \cdot 10^{-5} = (0,328 \pm 0,005) + (3,92 \pm 0,26) \cdot 10^{-3} \cdot c(S_2O_3^{2-}) \quad \text{Equação 3}$$

$$R^2 = 0,9913; s_{res} = 0,0007; rA = 0,18 \text{ mol/L}; df = 1$$

Embora com poucos pontos (grau de liberdade igual a 1), a qualidade do ajuste é suficiente a ponto de permitir considerar o fenômeno. A inclinação, portanto, está associada ao coeficiente de atividade da espécie neutra, ou salting-out. Isso porque a força iônica é proporcional à concentração do sal como mostra a Equação 4.

$$I = 3 c(S_2O_3^{2-}) \quad \text{Equação 4}$$

Mesmo não se observando o efeito linear, o sulfato apresentou um efeito positivo pronunciado (elevação média de 41%) (Tabela 4), sendo, portanto, mais adequado para extração do DEG empregando a LLE/LTP. Com relação à concentração do sulfato de sódio, observou-se (Tabela 4) que ambas as

concentrações utilizadas foram estatisticamente iguais, entretanto, optou-se pela concentração de $0,6 \cdot 10^6 \text{ mg L}^{-1}$ para garantir melhor precisão dos resultados.

Posteriormente, as melhores condições de extração, obtidas nos testes preliminares, foram avaliadas pelo planejamento fatorial 2^2 . Um estudo, simultâneo foi realizado para avaliar a polaridade do meio, alterando a proporção entre acetonitrila (ACN) e acetato de etila (ACT) e a presença ou não do sal Na_2SO_4 . A utilização de uma mistura de solventes orgânicos é uma alternativa que pode aumentar a eficiência da extração quando há a utilização de sais em uma extração líquido-líquido. (GRECCO et al., 2018)

Na Tabela 5, têm-se as variáveis utilizadas no planejamento fatorial 2^2 e os valores das médias das áreas dos picos, para diferentes proporções dos solventes extratores assim como o uso ou não do sal. A diferença média entre o efeito da presença e ausência de cada variável foi comparada com o desvio padrão *pooled*, obtido pela raiz quadrada dos valores de desvio padrão (S).

Tabela 5 - Resumo dos valores obtidos para o planejamento experimental 2^2 e os códigos dos fatores estudados para DEG.

Ensaio	Média das Áreas. 10^{-5}	SD. 10^{-5}	%CV	Code (ACN)	Code (sulfato)	interação
1	0.450	0.088	20%	-1	-1	1
2	0.554	0.047	9%	-1	1	-1
3	0.465	0.054	12%	1	-1	-1
4	0.527	0.073	14%	1	1	1
Média das diferenças				-0.0030	0.0415	-0.0105
s pooled				0.0779	0.0779	0.0779
p-value				0.97	0.63	0.90
				nsig	nsig	nsig

nsig = não significativo

Constatou-se pelos resultados da Tabela 5 que não houve diferença significativa ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) na extração do DEG da cerveja. Ou seja, diminuir a polaridade da solução extratora adicionando acetato de etila não interferiu significativamente na extração do DEG. Portanto, o método otimizado

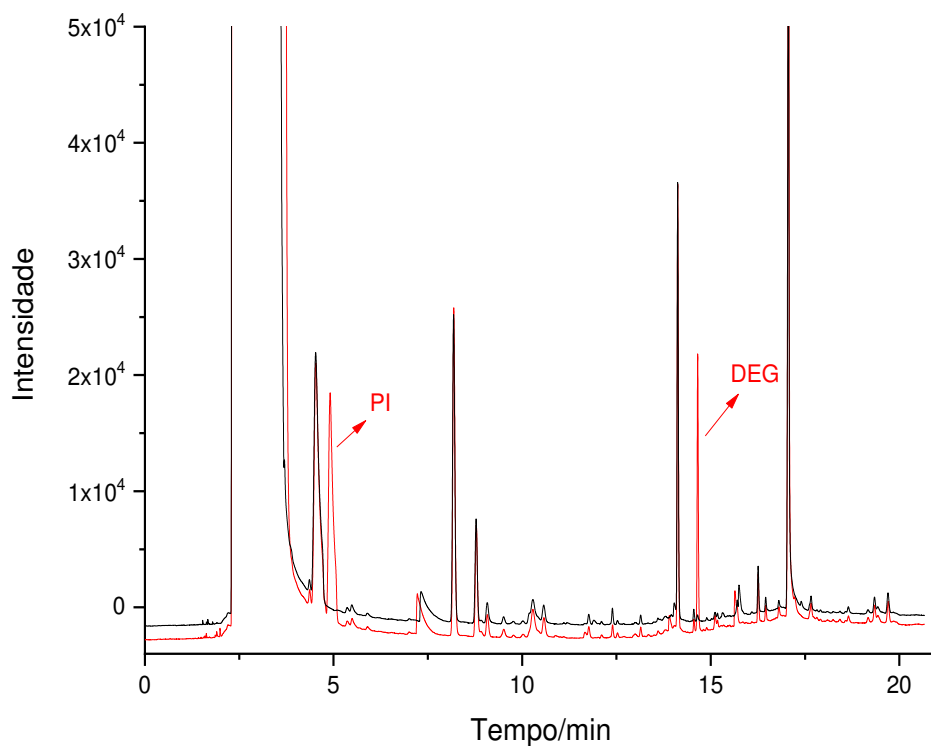
consiste em empregar 4.0 mL de acetonitrila, como solvente extrator, 4.0 mL de amostra de cerveja contendo sulfato de sódio na concentração de 0.6 mg L⁻¹, 1 min de agitação da mistura em vórtex, resfriamento de 6 h em *freezer* a -20 °C para separação das fases e análise por GC-FID.

3.2. Validação

3.1.1. Seletividade

Para avaliar a seletividade da LLE/LTP-GC/FID, o método otimizado foi aplicado em amostras de cerveja isentas de DEG. Posteriormente, essas amostras foram fortificadas com DEG e PI e submetidas novamente ao método de extração e análise. Os cromatogramas referentes a essas amostras foram comparados, não sendo observado nenhum interferente com resposta no tempo de retenção dos analitos de interesse, PI ($t_R = 4.911$ min) e DEG ($t_R = 14.654$ min), o que ressalta a seletividade do método (Figura 2).

Figura 2. Cromatogramas de extratos obtidos de amostras de cerveja isentas de DEG (preto) e contendo PI ($t_R= 4,911$ min) e DEG ($t_R= 14,654$ min) ambos na concentração de 50 mg L^{-1} (Vermelho).



3.1.2. Efeito de Matriz

O efeito de matriz na resposta cromatográfica para DEG foi avaliado pela comparação entre os valores de inclinação e do intercepto dos dados das curvas analíticas em solvente e no extrato da matriz utilizando o teste t. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados da comparação da inclinação e do intercepto para avaliação do efeito de matriz com base no teste t.

Curva preparada em Extrato		Curva preparada em solvente		Comparação das duas curvas	
t calc	1.32	t calc	3.09	t calc	2.33
p-value	0.279	p-value	0.054	p-value	0.102
	nsig		nsig		nsig

nsig = não significativo

Nesse estudo foi observado que os coeficientes de correlação para ambas as curvas analíticas foram maiores que 0.99. As respostas das médias nos diversos níveis de concentração do analito para as curvas, ao serem comparadas pelo teste t a um nível de probabilidade de 95% (valor de $p > 0,05$) foram estatisticamente iguais e não foi observada diferença significativa. Pode-se concluir assim que a matriz não interfere nas respostas cromatográficas do DEG.

3.1.3. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

Para determinar a concentração do DEG que geravam um sinal da ordem requerida, amostras de cerveja em baixas concentrações de DEG foram submetidas ao método de extração e análise. Foram obtidos LD igual a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ e LQ iguais a $10,0 \text{ mg L}^{-1}$. O desempenho do método proposto em relação aos limites de detecção e quantificação são iguais ou ligeiramente melhores que outros estudos apresentados na literatura. (CALDEIRA et al., 2021; HOLLOWAY et al., 2010)

3.1.4. Linearidade da faixa de trabalho

Para o estudo de linearidade, fez-se uma análise de variância dos valores de y para cada valor de x, para assim definir qual seria o melhor modelo de regressão (MMQP – modelo de mínimos quadrados ordinários, ou MMQO – modelo de mínimos quadrados ponderados) a ser aplicado para a obtenção da equação que pretende prever os resultados de x a partir de qualquer valor de y. A variância foi calculada pela

equação

5:

$$S_{y_i}^2 = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 \quad \text{Equação 5}$$

Onde: j representa o j-ésimo resultado para o conjunto de réplicas i; m representa o número réplicas para a resposta analítica y em cada ponto. Ou seja, j variou de 1 a 5 (5 pontos da curva) e m = 3 (análises realizadas em triplicatas). As variâncias são apresentadas na Tabela 7.

Tabela 7. Variâncias dos valores de y para cada um dos níveis de concentração

Concentração de DEG (mg L⁻¹)	Cálculo da Variância
10	149.62
20	598.50
25	934.96
35	1833.16
50	3740.67

Para determinar se a variância de y pode ser considerada constante, foi aplicado o teste de Cochran. A hipótese nula (H0) é que as variâncias sejam todas iguais e a hipótese alternativa (H1) é que pelo menos uma das variâncias seja diferente das outras. Pelo teste estatístico usado o valor obtido para C foi 0.515. O valor $C_{\text{crítico}}$ ao nível de significância de 5% para os 5 pontos analisados em triplicata é de 0.6838. Se $C < C_{\text{crítico}}$, aceita-se a hipótese nula (dados homocedásticos). A qualidade do ajuste linear foi também verificada e confirmada pelo coeficiente de correlação (r) maior que 0.995.

Como $C < C_{\text{crítico}}$, o MMQO pode ser utilizado, ou seja, a equação de reta pode ser representada como $y = a + bx$. A equação da reta obtida está representada na Tabela 8. Os coeficientes de determinação (r^2) obtidos para o DEG foi superior a 0,99, indicando a boa linearidade do método. (MAPA, 2015)

1 **Tabela 8.** Parâmetros de validação do método, faixa linear, coeficiente de determinação (R^2), nível de fortificação (NF), % de
 2 recuperação, repetibilidade e precisão intermediária resultantes do método analítico LLE/LTP-GC/FID desenvolvido para a análise
 3 de DEG em amostras de cerveja.

4

Composto	Faixa-linear/mg L ⁻¹	Equação Linear	Coeficiente de determinação (r^2)	NF (mg L ⁻¹)	Recuperação (%R)	Repetibilidade (%CV)	Precisão Intermediária (%CV)
DEG	10-50	y = 0.0128x + 0.0204	0.9914	10	106 ± 0,10	11	17
				30	94 ± 0,24	8	16
				50	104 ± 0,91	16	18

5

6

7

8

9

3.1.5. Exatidão e precisão

A precisão foi expressa em termos de repetibilidade e precisão intermediária, sendo esses critérios expressos em termos do CV, enquanto a exatidão foi expressa em termos de recuperação. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

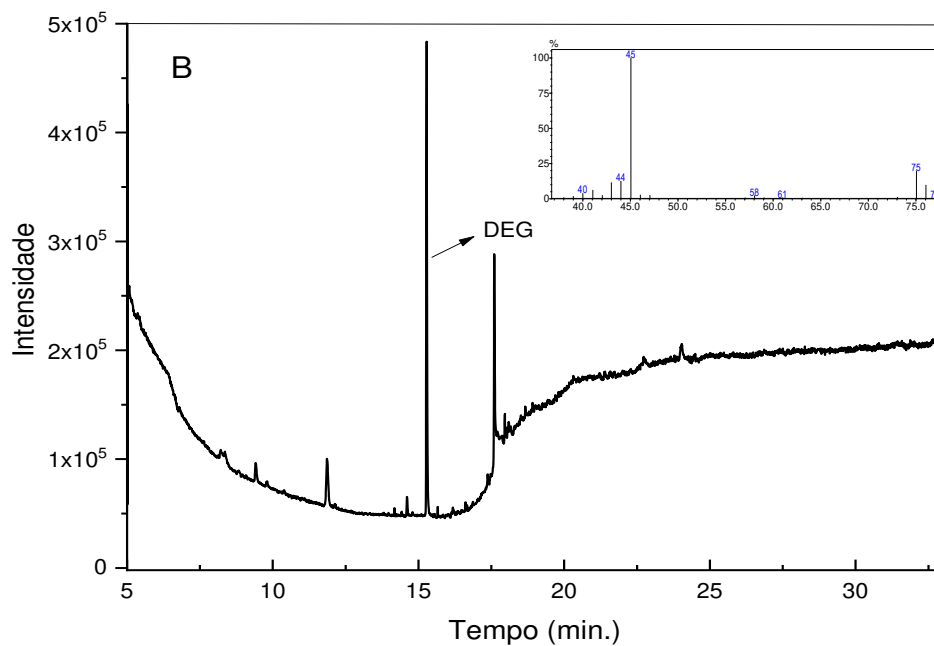
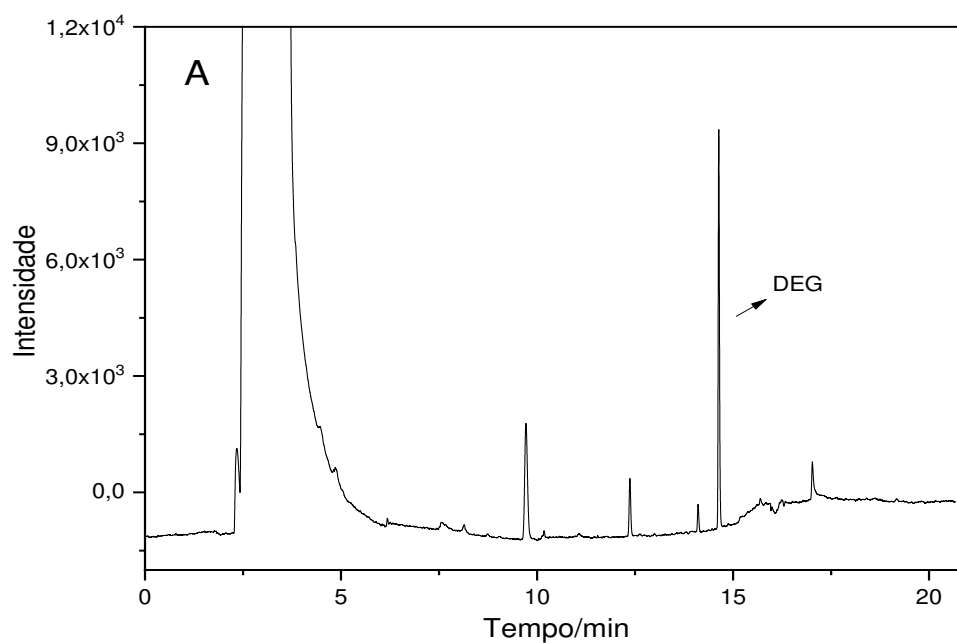
Com os procedimentos analíticos utilizados para determinar o DEG em amostras de cerveja, os valores de recuperações obtidos deveriam estar na faixa de 90 a 107%, em média, em cada nível de fortificação, apresentando valores de coeficiente de variação menores que 20% ($CV \leq 20\%$). (MAPA, 2015) Os valores obtidos nesse trabalho (Tabela 8) estão de acordo com os requisitos proposto pelo MAPA para validação de métodos analíticos em alimentos, portanto, o procedimento ELL/PBT-GC/FID foi adequado para determinar o DEG em amostras de cerveja.

4. Aplicação do método em amostras autênticas

Para demonstrar a aplicabilidade do método ELL/PBT-GC/FID desenvolvido para o controle de qualidade de cerveja, este foi aplicado em cervejas de diferentes marcas, fabricantes e lotes, comercialmente disponíveis em Viçosa e região.

Das 28 amostras analisadas, 13 pertenciam à cervejaria cuja presença de DEG tinha sido detectada, enquanto as demais amostras foram de marcas diversas. Todas as amostras de cerveja testadas, que não estavam relacionadas à marca suspeita, apresentaram resultados negativos, mostrando que são seguras para o consumo. Foi detectada a presença de DEG em apenas três amostras de cerveja das consideradas contaminadas, sendo que em duas a concentração estava abaixo do limite de quantificação do método. A concentração de DEG na terceira amostra foi de 1567,10 mg L⁻¹. Este resultado está de acordo com os dados apresentados por Caldeira *et al*⁴ que encontraram DEG em uma faixa de concentração que variou de 1000 a 2000 mg L⁻¹ em 1% das amostras analisadas. Para confirmação dos resultados obtidos, as amostras contaminadas foram reanalisadas por GC-MS. A presença de DEG foi confirmada, pelo tempo de retenção, bem como pela biblioteca NIST e pelo espectro de massa (íon mais intenso foi o $m/z=45$). A Figura 3 mostra os cromatogramas da amostra de cerveja contaminada com DEG.

Figura 3. Cromatogramas do extrato da amostra de cerveja contaminada com DEG analisada por GC/FID ($t_R=14,654$ min) na Figura 3A e por GC-MS ($t_R=15,250$ min) com espectro de massa em destaque na Figura 3B.



Vale ressaltar que os resultados positivos para a presença de DEG foram encontrados apenas na marca suspeita e que a contaminação identificada está relacionada a uma falha específica na produção de cervejas (SALES, 2021), que pode ser monitorada, empregando métodos de triagem de baixo custo como o descrito neste trabalho.

5. CONCLUSÕES

O método LLE/LTP-GC-FID otimizado e validado para a extração de dietilenoglicol em amostras de cerveja resultou em um método simples, eficaz e de baixo custo, sendo viável para a determinação desse contaminante em amostras de cerveja com recuperações que variaram entre de 94% e 106%. Além disso, a extração do composto e a limpeza do extrato ocorrem simultaneamente.

O método foi aplicado em 28 amostras de cervejas sendo a presença de DEG detectada em três amostras, na qual apenas uma estava acima do limite de quantificação. A partir dos resultados obtidos, conclui-se a importância do método desenvolvido para o controle de qualidade de amostras de cerveja, uma vez que estudos como esse são escassos e o uso do DEG é usual nos processos de fabricação de bebidas.

6. REFERÊNCIAS

- ANVISA. **ANVISA**. Disponível em: <https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/19194581/doi-2017-07-25-resolucao-rdc-n-166-de-24-de-julho-de-2017-19194412>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- CALDEIRA, L. R. et al. Simultaneous quantification of ethylene glycol and diethylene glycol in beer by gas chromatography coupled to mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 346, n. December 2020, p. 128871, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128871>>.
- CAMPONE, L. et al. Determination of mycotoxins in beer by multi heart-cutting two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry method. **Food Chemistry**, v. 318, n. April 2019, p. 126496, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126496>>.
- COSTA, A. I. G. et al. Determination of pesticides in lettuce using solid-liquid extraction with low temperature partitioning. **Food Chemistry**, v. 181, p. 64–71, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.070>>.
- DE PAULA, C. et al. Recognizing drug-facilitated crimes: Detection and quantification of benzodiazepines in beverages using fast liquid–liquid extraction with low temperature partitioning and paper spray mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 10, n. 9, p. 1348–1357, 2018.
- DE PINHO, G. P. et al. Optimization of the liquid-liquid extraction method and low temperature purification (LLE-LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, n. 10, p. 1307–1311, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.03.006>>.
- GARAVAGLIA, C.; SWINNEN, J. Economics of the Craft Beer Revolution: A Comparative International Perspective. In: GARAVAGLIA, C.; SWINNEN, J. (Org.). . **Econ. Perspect. Cr. Beer A Revolut. Glob. Beer Ind.** Cham: Springer International Publishing, 2018. p. 3–51. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-58235-1_1>.
- GONZÁLEZ-JARTÍN, J. M. et al. A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer. **Food Chemistry**, v. 275, n. August 2018, p. 703–710, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.162>>.
- GOULART, C. O. L. et al. Analysis of Diglycolic Acid After Mass Poisoning by Diethylene Glycol. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 64–68, 2022.
- GOULART, S. M. et al. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–1323, 2008.

GRECCO, C. F. et al. Extração líquido-líquido assistida pelo efeito salting out para análise de amostras biológicas. **Scientia Chromatographica**, v. 10, n. 2, p. 99–110, 2018.

HAGE, D. S. Chromatography. **Princ. Appl. Clin. Mass Spectrom. moléculas, peptídeos e patógenos**. Amsterdã: Elsevier, 2018. p. 1–32. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128160633000013>>.

HELENO, F. F. et al. Otimização, validação e aplicação de método para determinação da concentração residual de difenoconazol em morangos após múltiplas aplicações. **Quím. Nova**, v. 37, n. January, p. 153–157, 2014.

HOLLOWAY, G. et al. Screening method for ethylene glycol and diethylene glycol in glycerin-containing products. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, n. 3, p. 507–511, 2010.

LAGO, L. O. et al. QuEChERS-LC-QTOFMS for the simultaneous determination of legislated and emerging mycotoxins in malted barley and beer using matrix-matched calibration as a solution to the commercial unavailability of internal standards for some mycotoxins. **Food Chemistry**, v. 345, n. December 2020, p. 1–13, 2021.

MAPA. **Manual de Garantia da Qualidade Analítica**. Disponível em: <[file:///C:/Users/carol/Downloads/Manual-de-Garantia-Analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed \(3\).pdf](file:///C:/Users/carol/Downloads/Manual-de-Garantia-Analitica-ilovepdf-compressed-ilovepdf-compressed%20(3).pdf)>.

RAHIM, A. A. et al. Simultaneous determination of diethylene glycol, diethylene glycol monoethyl ether, coumarin and caffeine in food items by gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1412–1416, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.121>>.

RAUSCH, A. K.; BROCKMEYER, R.; SCHWERDTLE, T. Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry multi-method for the determination of 41 free and modified mycotoxins in beer. **Food Chemistry**, v. 338, n. July 2020, p. 127801, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127801>>.

RIBANI, M. et al. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. **Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SALES, G. Z. F. de. **Análise crítica sobre o caso de contaminação na Cervejaria Backer**. 2021. 1–32 f. 2021.

SANTOS, M. S. dos; RIBEIRO, F. de M. **Cervejas e refrigerantes**. 21. ed. São Paulo: CETESB, 2005.

SILVA, T. L. R. et al. Microextraction technique associated with gas chromatography – mass spectrometry for determining pesticide residues in urine. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2022.

SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 9ª edição ed. São Paulo:

Cengage, 2014.

VIEIRA, A. C. et al. Multi-target optimization of solid phase microextraction to analyse key flavour compounds in wort and beer. **Food Chemistry**, v. 317, n. February, p. 126466, 2020.

VIEIRA, H. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R. de. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535–540, 2007.

WANNENMACHER, J.; GASTL, M.; BECKER, T. Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 4, p. 953–988, 2018.

ZANELLA, D. et al. Comparison of headspace solid-phase microextraction high capacity fiber coatings based on dual mass spectrometric and broadband vacuum ultraviolet absorption detection for untargeted analysis of beer volatiles using gas chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 1141, p. 91–99, 2021.

ZHENG, S. J. et al. Stable isotope labeling-solid phase extraction-mass spectrometry analysis for profiling of thiols and aldehydes in beer. **Food Chemistry**, v. 237, p. 399–407, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.090>>.