

Determinação de compostos orgânicos voláteis em cervejas artesanais por cromatografia gasosa e amostragem por headspace

Determination of volatile organic compounds in craft beers by gas chromatography and headspace sampling

Determinación de compuestos orgánicos volátiles en cervezas artesanales mediante cromatografía de gases y muestreo del espacio de cabeza

Recebido: 20/08/2020 | Revisado: 24/08/2020 | Aceito: 28/08/2020 | Publicado: 30/08/2020

Gisele Gonçalves Bortoleto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3425-3888>

Fatec Piracicaba “Deputado Roque Trevisan”, Brasil

E-mail: gisele.bortoleto@fatec.sp.gov.br

Winston Pinheiro Claro Gomes

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1165-8572>

Fatec Piracicaba “Deputado Roque Trevisan”, Brasil

E-mail: winston.gomes@fatec.sp.gov.br

Resumo

O mercado das cervejas artesanais encontra-se em plena expansão e, nesse cenário, o Brasil se apresenta como um dos países mais inovadores do segmento. Os compostos orgânicos voláteis estão presentes nas cervejas artesanais como os grandes responsáveis pelo aroma e sabor do produto e, portanto, a determinação destes é imprescindível tanto para análise do produto final quanto durante o controle do processo produtivo. Assim, este trabalho teve por objetivo a otimização de um método analítico para quantificação de compostos voláteis em cervejas artesanais, empregando a cromatografia a gás com amostragem por headspace. O estudo envolveu ensaios de descarbonatação da amostra analisando diferentes tempos de agitação e de otimização das condições da amostragem que empregou um planejamento fatorial 2^3 , considerando os fatores temperatura, tempo de aquecimento do forno de headspace e volume de injeção da amostra. Os analitos acetaldeído, acetato de etila, n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico tiveram seus limites de detecção e de quantificação calculados e foram determinados em cervejas artesanais dos estilos American Lager, Dunkel, Helles, IPA, Ale, Wit, Weiss e Dobbel. Realizou-se análise multivariada empregando-se a Análise por Componentes Principais e Hierárquica de Cluster e observou-se a influência dos álcoois

superiores na separação das amostras. O método se mostrou adequado para quantificação de voláteis em cervejas artesanais e pode ser empregado tanto na análise do produto final, como durante a formação desses compostos durante o processo fermentativo.

Palavras-chave: Análises de VOC's; HS-GC-FID; Classificação de cervejas; Análise multivariada.

Abstract

The craft beer market is booming and, in this scenario, Brazil presents itself as one of the most innovative countries in the segment. Volatile organic compounds are present in craft beers as being largely responsible for the aroma and flavor of the product and, therefore, their determination is essential both for analysis of the final product and during the control of the production process. Thus, this work aimed to optimize an analytical method for quantification of volatile compounds in craft beers, using gas chromatography with headspace sampling. The study involved sample decarbonation tests analyzing different agitation times and optimization of the sampling conditions that employed a factorial design 2^3 , considering the factors temperature, heating time of the headspace oven and sample injection volume. The acetaldehyde, ethyl acetate, n-propanol, isobutanol and isoamyl alcohol analytes had their detection and quantification limits calculated and were determined in American Lager, Dunkel, Helles, IPA, Ale, Wit, Weiss and Dobbel craft beers. Multivariate analysis was performed using Principal Component and Hierarchical Cluster Analysis and the influence of higher alcohols on sample separation was observed. The method proved to be suitable for quantification of volatiles in the craft beers and can be used both in the analysis of the final product, and during the formation of these compounds during the fermentation process.

Keywords: VOC's analysis; HS-GC-FID; Classification of beers; Multivariate analysis.

Resumen

El mercado de la cerveza artesanal está en la cima y, en este escenario, Brasil se presenta como uno de los países más innovadores del segmento. Los compuestos orgánicos volátiles están presentes en las cervezas artesanales como los principales responsables del aroma y sabor del producto y, por lo tanto, su determinación es fundamental tanto para el análisis del producto final como durante el control del proceso productivo. Así, este trabajo tuvo como objetivo optimizar un método analítico para la cuantificación de compuestos volátiles en cervezas artesanales, utilizando cromatografía de gases con muestreo de "espacio de cabeza". El estudio involucró pruebas para la descarbonatación de las muestras analizando diferentes

tiempos de agitación y para la optimización de las condiciones de muestreo, en las cuales se utilizó un diseño factorial 2^3 , considerando los factores temperatura, tiempo de calentamiento del horno de “espacio de cabeza” y volumen de inyección de la muestra. Los analitos acetaldehído, acetato de etilo, n-propanol, isobutanol y alcohol isoamílico tenían sus límites de detección y cuantificación calculados y se determinaron en cervezas artesanales de los estilos American Lager, Dunkel, Helles, IPA, Ale, Wit, Weiss y Dobbel. El análisis multivariado se realizó utilizando el componente principal y análisis de conglomerados jerárquicos y se observó la influencia de alcoholes superiores en la separación de muestras. El método demostró ser adecuado para la cuantificación de volátiles en las cervezas artesanales y se puede usar tanto en el análisis del producto final como durante la formación de estos compuestos en el proceso de fermentación.

Palabras clave: Análisis de VOC; HS-GC-FID; Clasificación de cervezas; Análisis multivariable.

1. Introdução

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a cerveja é definida como uma bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido, previamente, a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro (Brasil, 2019).

No decorrer dos anos inúmeros tipos de cervejas foram surgindo e diversos estilos de cervejas foram se consolidando. No entanto, uma das principais classificações da bebida ainda pode se dar pelo tipo de processo fermentativo ao qual a cerveja é submetida (Preddy, 2009). As cervejas estilo “Ale” são conhecidas como cervejas de alta fermentação, ou seja, são produzidas em temperatura ao redor de 18°C durante 4 ou 5 dias. Já, as cervejas estilo “Lager”, conhecidas como de baixa fermentação, são produzidas em temperaturas próximas de 12°C que duram 8 ou 9 dias (Preddy, 2009; Mega, Neves & Andrade, 2011).

Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, ficando atrás apenas da China, que lidera o ranking, e dos Estados Unidos (Cervbrasil, 2018). De acordo com o Anuário Estatístico do MAPA (Brasil, 2020), em 2019 o país alcançou a marca de 1.209 cervejarias registradas, o que demarca um segmento de mercado em plena expansão. Segundo Jonny Forsyth, diretor associado da agência de inteligência de mercado “*Mintel*

Food & Drink”, o mercado das cervejas artesanais do Brasil é o segundo mais inovador do mundo, estando atrás apenas do norte-americano. Em 2017 os EUA concentraram 17% de todos os lançamentos de cervejas artesanais, enquanto o Brasil atingiu a marca de 9% (Daniells, 2018). Como projeção do MAPA (Brasil, 2020), considerando o grande crescimento no número de registros de cervejarias e cervejas que se mostra sustentado em décadas, o país alcançará a marca de 7.504 cervejarias em 2025, se mantida a taxa de 36% de crescimento dos últimos cinco anos, o que ultrapassa o número de cervejarias dos EUA no último balanço disponível de 2018 com 7.346 cervejarias.

Nesse cenário, otimizar uma metodologia analítica para se determinar os principais responsáveis pelo aroma e sabor (flavor) de cervejas é de grande importância, principalmente para análise e controle de novos produtos. Os principais compostos orgânicos voláteis (VOC – do inglês – *Volatiles Organic Compounds*) que se destacam para a formação do flavor das cervejas são os aldeídos, ésteres e álcoois superiores, assim como as dicetonas vicinais se destacam como off-flavor (Preedy, 2009; Pires & Brányik, 2015).

Dentre as diversas técnicas de análise química que analisam VOC's, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido à eficiência com que efetua separação, identificação e determinação dos componentes químicos em misturas complexas. (Collins, Braga & Bonato, 2006; Skoog *et al.*, 2017). Aliada à GC, a amostragem por *headspace* tem sido muito utilizada para análises de amostras que possam contaminar o sistema cromatográfico e que não podem ser injetadas diretamente na coluna, como é o caso das cervejas artesanais (SILVA *et al.*, 2008; Tian, 2010; Chen, 2018; Anderson, 2019; Gomes, Yoshinaga & Bortoleto, 2020). Além disso, é um procedimento que não necessita de solventes para realizar a extração (Cruwys *et al.*, 2002; Kolb & Ettre, 1997; Nascimento *et al.*, 2018, Anderson *et al.*, 2019).

Dessa forma, nesse trabalho realizou-se a otimização de um método analítico para análises de cervejas artesanais por cromatografia gasosa empregando a amostragem por *headspace* e foi possível obter o perfil da composição de alguns estilos das cervejas analisadas quanto aos compostos voláteis acetaldeído, acetato de etila, n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico.

Por meio de análises multivariadas “Análise de Componentes Principais” e “Análise Hierárquica de Cluster” observou-se o agrupamento de algumas cervejas e a influência dos álcoois superiores nessa classificação.

2. Metodologia

Todas as amostras foram obtidas no comércio local e nas cervejarias da cidade de Piracicaba/SP, sendo duas cervejas IPA (marca A e B), uma cerveja Ale (marca A), um cerveja Pilsen (marca A), um cerveja Dubbel (marca A), três cervejas Wit (marca A, H e I), um cerveja Weiss (marca A), duas cervejas Dunkel (marca C e D), um cerveja American Lager (marca E), um cerveja Helles (marca F) e um cerveja Stout (marca G).. A água utilizada é deionizada (condutividade de 18,2 MΩ cm a 25 °C), os reagentes acetaldeído, acetato de etila, n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico foram adquiridos da Sigma-Aldrich e o etanol foi adquirido da Merck, sendo todos de grau cromatográfico.

2.1. Descarbonatação das cervejas

Para avaliar o melhor tempo para descarbonatar amostras de cervejas, realizou-se ensaios em diferentes tempos de agitação magnética e posterior análise das amostras por cromatografia gasosa. O teor de etanol quantificado por HS-GC-FID foi comparado com o valor declarado no rótulo da cerveja. Neste estudo avaliou-se os tempos de 0,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0; e 20,0 minutos. A descarbonatação é prevista pelo manual de análise de alimentos elaborado pelo Instituto Adolfo Lutz (2008).

2.2. Planejamento fatorial 2³

Os ensaios experimentais para otimização das condições analíticas do *headspace* foram baseados nos experimentos de um planejamento fatorial 2³, realizado com dois níveis e três fatores, utilizando-se a cerveja Pilsen A. Como os ensaios do planejamento foram realizados em duplicata, o estudo envolveu 16 experimentos.

Foram considerados como fatores: temperatura do forno do *headspace* (T), tempo de aquecimento no forno do *headspace* (t) e volume de da amostra coletada no *headspace* e injetada no GC-FID (v). Os dois níveis (“+” e “-“) avaliados para o fator temperatura foram 50^oC (-) e 80^oC (+), para o fator tempo foram 5 minutos (-) e 15 minutos (+) e para o fator volume foram 0,5 mL (-) e 1,5 mL (+). Como resposta para avaliar os efeitos, considerou-se a área do pico obtido no tempo de retenção 2,3 minutos dos cromatogramas, correspondente ao acetato de etila.

Para análise dos dados, utilizou-se Software Minitab®.

2.3. Análises químicas

Todas amostras foram submetidas à etapa de descarbonatação, previamente à análise cromatográfica, que consistiu em manter as cervejas sob agitação por 5 minutos.

As concentrações dos analitos acetaldeído, acetato de etila, n-propanol, isobutanol, isoamílico foram determinadas em cromatógrafo *PerkinElmer*, modelo GC Clarus 600, equipado com coluna cromatográfica capilar ELITE WAX (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) e detector de ionização de chama (FID). O amostrador automático empregado é da marca *Combipal*, modelo *CTC Analytics, Pal System*, com o forno para *headspace*. O gás de arraste utilizado foi N₂, com fluxo de 1,2 mL min⁻¹, do hidrogênio foi 45 mL min⁻¹ e do ar sintético foi 450 mL min⁻¹, todos com alto grau de pureza (99,999%). A temperatura do injetor foi 150 °C e a temperatura da coluna foi programada para 45 °C por 1,5 min, com aquecimento a uma taxa de 9°C min⁻¹, até 153 °C, permanecendo nesta temperatura por 1,5 min. A temperatura do detector foi 300 °C. As condições otimizadas do *headspace* foram: volume da amostra descarbonatada no vial = 5 mL, tempo de aquecimento = 5 minutos, temperatura do forno = 80 °C e volume de coleta e injeção = 1,5 mL a uma velocidade de 250 µL s⁻¹, empregando-se o “*split*” de 50:1.

2.4 Curvas analíticas cromatográficas

Preparou-se as curvas analíticas de calibração externa com cinco pontos de concentração padrão, em 5% de etanol (v/v), para os analitos acetaldeído, acetato de etila, n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico. Utilizou-se a concentração de etanol de 5% (v/v) considerando-se o teor alcoólico presente em cervejas artesanais, que variam entre 2,4 a 14,0% (Strong & England, 2015). Erros determinados e indeterminados estão geralmente associados ao preparo de padrões, principalmente quando o meio das curvas é muito diferente da matriz da amostra, então buscou-se trabalhar com o meio de concentração alcoólica aproximado ao das cervejas artesanais (Soares, 2001).

Para quantificação do etanol, preparou-se as soluções padrão em água ultrapura, assim como Costa (2017) e Ruvalcaba *et al.* (2019).

Todos os pontos foram injetados no cromatógrafo em triplicata.

Calculou-se os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dos compostos de interesse, utilizando o programa *Action Stat* (Equipe Estatcamp, 2014).

As quantificações dos analitos foram realizadas empregando-se as curvas analíticas

As análises estatísticas dos resultados das concentrações foram realizadas empregando-se o *OriginPro 2019b* e o software *Past 4.0* (Hammer, Harper & Ryan, 2001; Originpro, 2019).

2.5. Análises estatísticas

Os resultados obtidos na análise de descarbonatação foram submetidos a análise de variância (ANOVA) a um nível de significância de $\alpha = 0,05$. O teste de Tukey foi aplicado para comparar a média dos dados, utilizando o software RStudio (Version 1.3.1073).

Os resultados obtidos nas análises químicas foram submetidos a Análise por Componentes Principais e Hierárquica de Cluster, utilizando os softwares *OriginPro 2019b* e o software *Past 4.0* (Hammer, Harper & Ryan, 2001; Originpro, 2019).

3. Resultados e Discussão

3.1. Ensaio de descarbonatação

Segundo recomendação do Instituto Adolfo Lutz (2008), bebidas com alto teor de gás carbônico devem ter esse interferente analítico retirado das amostras, previamente às análises. Assim, o estudo de descarbonatação foi realizado utilizando uma cerveja estilo Lager (Pilsen A) e uma cerveja estilo Ale (Ale A), variando os tempos de agitação magnética da amostra. As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados das recuperações do teor de etanol considerando os valores declarados nos rótulos. Utilizou-se a curva de faixa de concentração de 0,5 à 14,5 % (v/v), obtida com coeficiente de correlação $R^2 = 0,998958$, representada pela equação $y = -112,073750 + 1010,793095x$.

Tabela 1. Recuperação do etanol em cerveja artesanal do tipo Lager (Pilsen A) (4,3% (v/v)) após ensaios que empregam diferentes tempos para descarbonatação.

Tempo (min)	Teor Alcoólico (% (v/v))	Recuperação (%)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
0,0	4,772a	110,988a	1,138	23,85
2,5	4,554b	105,912b	0,302	6,629
5,0	4,614c	107,296c	0,056	1,213
7,5	4,608d	107,171d	0,175	3,802
10,0	4,642e	107,964e	0,109	2,348
12,5	4,650f	108,147f	0,010	0,216
15,0	4,763g	110,777g	0,291	6,113
20,0	4,771h	110,965h	0,031	0,641

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Fonte: Autores.

Tabela 2. Recuperação do etanol em cerveja artesanal do tipo Ale (Ale A) (4,9% (v/v)) após ensaios que empregam diferentes tempos para descarbonatação.

Tempo (min)	Teor Alcoólico (% (v/v))	Recuperação (%)	Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
0,0	4,876a	99,517a	0,164	3,357
2,5	5,106b	104,195b	0,115	2,245
5,0	5,330c	108,772c	0,041	0,762
7,5	5,112d	104,329d	0,052	1,024
10,0	5,323e	108,634e	0,028	0,524
12,5	6,497f	132,584f	0,663	10,20
15,0	5,389g	109,977g	0,009	0,166
20,0	5,989h	122,215h	1,068	17,83

*Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Fonte: Autores.

De acordo com Ribani *et al.* (2004), valores aceitáveis de recuperação devem estar entre 70% a 120%, com coeficientes de variação entre 1% a 2%, o que configuram ensaios com boas exatidão e precisão, respectivamente. Dessa forma, foram descartados os tempos 0,0; 2,5; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 minutos, que apresentaram coeficientes de variação acima de 2% em ambas as amostras e/ou em pelo menos uma amostra.

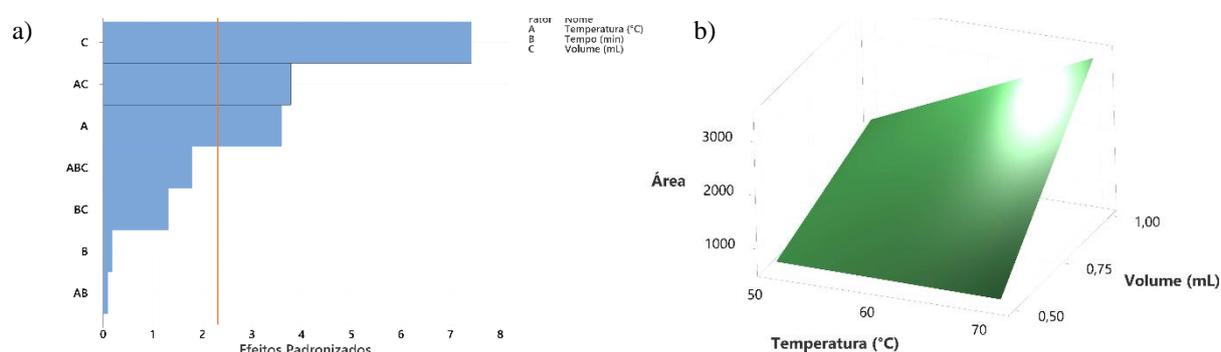
Considerou-se o tempo de descarbonatação de 5 minutos como o mais adequado para realizar as análises posteriores com boas precisão e exatidão em cervejas artesanais, já que em ambas as amostras apresentaram coeficientes de variação e de recuperação dentro do ideal (Ribani *et al.*, 2004). Também deve se considerar que é um tempo que não atrapalha consideravelmente frequência analítica de um método e não favorece a perda de analitos, que pode ocorrer com longos tempos de agitação (Silveira, 2010).

3.2. Planejamento fatorial 2^3

Elaborou-se um planejamento fatorial 2^3 para a otimização dos parâmetros de amostragem por *headspace*. Partiu-se das condições dispostas em nota técnica da *PerkinElmer* (Ruppel & Grecsek, 2005) e avaliou-se a temperatura e o tempo de aquecimento do forno de *headspace* e volume de injeção da amostra.

As Figuras 1a e 1b indicam os fatores que mais influenciam na resposta analítica.

Figura 1. Resultados da análise das repostas obtidas do planejamento fatorial 2^3 . a) Pareto de efeitos padronizados. b) Superfície de resposta para área.



Fonte: Autores.

A Figura 1a foi gerada a partir do gráfico do pareto que apresenta os efeitos padronizados, desta forma inserindo uma linha de referência que indicará o ponto mínimo para que os efeitos tenham significância estatística a partir do nível de confiança e significância estabelecidos (Mainardi & Bidoia, 2020). Os fatores à direita da linha 2,306 são estatisticamente significativos ao nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$). Desta forma, as variáveis representadas na Figura 1a pelas letras A (temperatura) e C (volume) e as interações entre A e C (temperatura e volume) são as que contribuiriam fortemente para aumento da

resposta analítica, ressaltando que quanto mais distante da linha, maior a significância desse fator no aumento do sinal analítico.

Na Figura 1b, apresentada como gráfico de superfície, considerando a relação das variáveis, fica evidente a correlação entre temperatura e volume e sua influência no decorrer da superfície, em função da área utilizada como resposta analítica.

A partir desse planejamento e dos resultados obtidos dos ensaios, decidiu-se considerar os parâmetros temperatura, tempo e volume iguais a 80°C, 5 minutos e 1,5 mL, respectivamente, como ótimos para análises de cervejas descarbonatadas empregando-se *headspace*, e foram os empregados nos estudos posteriores.

3.3. Curvas analíticas cromatográficas

Considerando que os VOC's são os principais responsáveis pelo aroma e sabor das cervejas (Preedy, 2009; Pires & Brányik, 2015), e que são inúmeros os presentes nas cervejas, neste estudo investigou-se a presença de acetaldeído, acetato de etila, n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico em cervejas artesanais. Para tal, alguns parâmetros analíticos foram levantados e calculados, os quais permitiram a análise desses compostos nas amostras obtidas.

Na Tabela 3 encontram-se os valores de tempo de retenção, faixa de concentração, equação da reta, coeficiente de correlação, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) para cada analito de interesse.

Tabela 3. Tempo de retenção, faixa de concentração, equação da reta, coeficiente de correlação, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) para cada analito de interesse.

Componentes	Tempo de retenção (min)	Concentração (mg L ⁻¹)	Equação da Reta	R ²	LD	LQ
Acetaldeído	1,797	0,967 - 14,50	$y = 137,24x + 8,0823$	0,994	1,33	4,03
Acetato de etila	2,260	4,18 - 66,88	$y = 231,83x + 33,619$	0,998	3,49	10,59
n-Propanol	3,510	10,71 - 85,68	$y = 36,72x + 358,2$	0,996	6,68	20,24
Isobutanol	4,198	5,10 - 61,20	$y = 95,138x - 114,77$	0,994	5,49	16,65
Isoamílico	5,663	5,36 - 85,84	$y = 63,158x + 117,9$	0,984	10,19	30,88

Fonte: Autores.

A partir da análise da Tabela 3, observa-se que o método possibilita a quantificação dos analitos de interesse em cervejas artesanais com certo limite, uma vez que estes, algumas vezes, podem estar fora das faixas de concentrações apresentadas na literatura. No entanto, vale ressaltar que as faixas de VOC's encontradas na literatura também são variáveis (Reed & Nagodawithana, 1991; Buiatti, 2009; Nespor, 2018; Preedy, 2009).

De acordo com (Preedy, 2009) valores de concentrações de acetaldeído em cervejas artesanais normalmente variam entre 2 e 20 mg L⁻¹ e o LQ do método é de 4,03 mg L⁻¹, ou seja, em algumas amostras, a quantificação deste analito poderá ficar comprometida. Já para o acetato de etila, valores de concentrações entre 10 e 70 mg L⁻¹ são normalmente encontradas em cervejas artesanais (Reed & Nagodawithana, 1991; Buiatti, 2009; Nespor, 2018; Preedy, 2009). Nesse caso, como os limites calculados estão abaixo desses valores, o método se apresenta como adequado para a quantificação de acetato de etila em amostras de cervejas.

Considerando os álcoois superiores, também observamos altos valores de limites de quantificação para os analitos n-propanol e álcool isoamílico, o que também pode comprometer a determinação destes em algumas cervejas, que os contenham em baixas concentrações.

Um procedimento que pode melhorar os parâmetros calculados é empregar uma coluna cromatográfica com pouco tempo de uso, intacta quanto à qualidade da fase estacionária, o que pode melhorar substancialmente as figuras de mérito do método.

3.4. Análises de cervejas artesanais

Utilizando o método otimizado, foram realizadas as análises químicas para obtenção das concentrações de acetaldeído, acetato de etila, n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico foram determinadas em diferentes estilos de cervejas, de diferentes marcas.

A Tabela 4 apresenta os resultados das análises de concentrações nas diferentes cervejas, nas quais a letra maiúscula representa a marca.

Tabela 4. Concentração dos compostos orgânicos voláteis determinados em cervejas artesanais de diferentes estilos e marcas.

Amostra	Acetaldeído (mg L ⁻¹)	Acetato de Etila (mg L ⁻¹)	n-Propanol (mg L ⁻¹)	Isobutanol (mg L ⁻¹)	Isoamílico (mg L ⁻¹)
IPA A	2,8 ± 0,3	19,2 ± 1,9	2,1 ± 2,8	17,7 ± 1,6	94,9 ± 6,8
Ale A	2,0 ± 0,1	23,4 ± 0,3	4,5 ± 3,0	22,0 ± 0,7	91,6 ± 4,4
Pilsen A	2,8 ± 0,1	16,6 ± 0,2	ND*	4,9 ± 0,8	94,3 ± 6,8
Dubbel A	2,8 ± 0,4	15,2 ± 0,2	42,7 ± 1,2	26,8 ± 0,9	167,8 ± 2,9
Wit A	3,5 ± 0,3	27,3 ± 4,4	55,6 ± 11,4	36,0 ± 5,3	122,8 ± 5,4
Weiss A	1,6 ± 0,3	28,4 ± 5,4	107,9 ± 7,4	38,7 ± 5,7	176,5 ± 22,4
IPA B	1,4 ± 0,1	15,2 ± 0,6	38,9 ± 2,5	18,4 ± 1,6	81,5 ± 6,1
Dunkel C	1,3 ± 0,1	21,6 ± 1,2	19,3 ± 6,0	34,5 ± 1,5	82,3 ± 7,2
Dunkel D	1,8 ± 0,1	16,7 ± 2,7	30,0 ± 1,9	23,1 ± 3,1	75,3 ± 2,8
American Lager E	1,2 ± 0,0	11,1 ± 0,9	ND*	ND*	42,7 ± 12,5
Helles F	4,3 ± 0,4	13,5 ± 2,5	16,4 ± 3,5	12,1 ± 1,0	63,5 ± 3,8
Stout G	1,3 ± 0,1	19,8 ± 0,6	76,4 ± 2,7	21,7 ± 0,4	127,3 ± 7,6
Wit H	ND*	18,1 ± 0,4	ND*	11,5 ± 2,5	134,3 ± 11,7
Wit I	1,0 ± 0,1	9,7 ± 1,1	ND*	43,9 ± 1,4	190,1 ± 8,9

*ND: Não detectado. Fonte: Autores.

É possível observar que nas cervejas American Lager E e na cerveja Wit H não foi possível quantificar mais de um analito. Ainda, também fica evidente o problema da determinação do n-propanol em determinadas cervejas, o que está diretamente relacionado aos limites de detecção desse composto. O que explica o problema de detecção do n-propanol é que sua separação do pico do etanol (que está presente em concentrações bem superiores) não foi eficiente, indicando perda de fase da coluna cromatográfica.

Entretanto, vale destacar que vários compostos voláteis foram quantificados com boas exatidão e precisão, atendendo aos limites calculados e é possível constatar que as concentrações desses compostos variam bastante de cerveja para cerveja.

Avaliando o analito acetaldeído, é importante mencionar que na fase jovem da cerveja este componente geralmente está presente em concentrações de 20 a 40 mg L⁻¹, mas diminui para concentrações em torno de 2 a 20 mg L⁻¹ no produto final. (Kobayashi, Shimizu & Shioya, 2008; Preedy, 2009). Considerando o limiar sensorial para esse composto, de acordo com Kobayashi, Shimizu & Shioya (2008) valores acima de 20 mg L⁻¹ conferem sabores de folhas verdes à cerveja de forma não positiva, enquanto Troilo *et al.* (2019) apontam o valor

do limiar sensorial como 25 mg L⁻¹. De qualquer forma, analisando a Tabela 4, é possível observar que todas as cervejas apresentaram teores de acetaldéido conforme o esperado, dentro das faixas encontradas na literatura e abaixo do limiar de percepção do analito (Kobayashi, Shimizu & Shioya, 2008; Preedy, 2009; Troilo *et al.*, 2019).

Considerando o analito acetato de etila, concentrações entre 10 e 80 mg L⁻¹ são normalmente encontradas nos mais diversos tipos de cervejas, considerando-se as diferentes faixas encontradas na literatura (Kobayashi, Shimizu & Shioya, 2008; Preedy, 2009; Nespor, 2018; Troilo *et al.*, 2019). Entretanto, de acordo com Troilo *et al.* e Kobayashi, Shimizu & Shioya, cervejas contendo acetato de etila com concentrações superiores a 30 mg L⁻¹ podem apresentar sabor adocicado e de solvente, não desejáveis. Analisando a Tabela 4, é possível observar que todas as cervejas artesanais analisadas apresentaram o acetato de etila dentro das faixas apresentadas na literatura e abaixo do limiar de percepção sensorial.

Com relação aos álcoois superiores totais presentes em cervejas, estes são os compostos sensoriais mais abundantes presentes na cerveja e valores de concentrações acima de 100 mg L⁻¹ podem afetar negativamente o sabor da cerveja (Pires & Brányik, 2015). Já, segundo Troilo *et al.* (2019) e Kobayashi, Shimizu & Shioya (2008), somente concentrações acima de 800 mg L⁻¹ de n-propanol, 200 mg L⁻¹ de isobutanol e 70 mg L⁻¹ de álcool isoamílico serão perceptíveis sensorialmente, podendo afetar negativamente o *flavor* da cerveja.

Destacam-se nos resultados apresentados na Tabela 4 algumas cervejas que apresentaram altos teores desses álcoois, como as Wits, a Weiss, a Dubbel e a Stout analisadas. Como são cervejas com características típicas, que derivam da alta quantidade de trigo presente nas Wits e na Weiss, altos teores de malte torrado como no caso da Dubbel e da Stout, além de outras especificidades de cada receita, estas justificariam a presença das altas concentrações de álcoois superiores em suas composições (Mosher & Trantham, 2017).

3.5. Classificação de cervejas artesanais

Existem muitas definições diferentes de estilos para cerveja, mas de acordo com as diretrizes apresentadas pelo *Beer Style Guidelines* de 2020 (Brewings Association, 2020), uma importante classificação se dá em duas categorias principais, Lagers e Ales, conhecidas como cervejas de fermentação no topo e no fundo, respectivamente, além da categoria que englobam os demais estilos de cervejas, muitas vezes um híbrido entre Lagers e Ales (Preedy, 2009; Mosher & Trantham, 2017; Brewers Association, 2020).

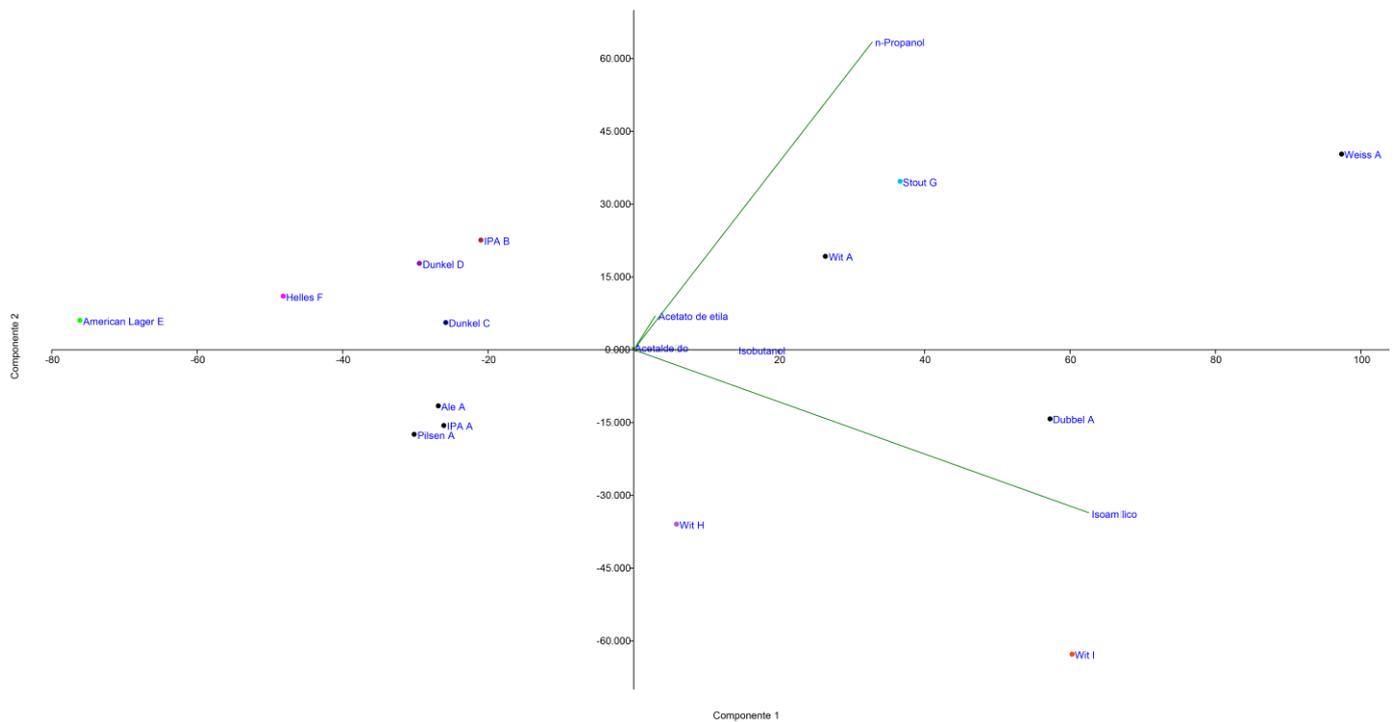
Cervejas Lagers são caracterizadas pelo uso de leveduras de baixa fermentação como a *Saccharomyces pastoranus*, que requerem baixas temperaturas durante fermentação e maturação ou condicionamento em condições muito frias. Ainda podem ser classificadas como European Lager, British Lager e American Lager, que apresentam um grande portfólio de produtos (Helles alemã, Dunkel alemã, Pilsener americana, entre outras).

As cervejas Ales são caracterizadas pelo uso de leveduras de alta fermentação como a *Saccharomyces cerevisiae* que empregam temperaturas mais quentes para realizar a fermentação. Por esta razão, produz compostos químicos adicionais que dão sabores a cerveja e como são cervejas mais fáceis de produzir existem inúmeras possibilidades de criação de produtos com diferentes perfis. Podem ser classificadas como European Ales, English, Scottish e Irish Ales e American Ales, que também trazem suas inúmeras variações (Witbier belga, Weiss alemã, Dobbel belga, India Pale Ale belga, Ale belga, entre outras) (Mosher & Trantham, 2017).

Considerando as cervejas empregadas nesse estudo, buscou-se encontrar possíveis diferenças e similitudes entre elas por meio de análise multivariada.

Utilizando-se da Análise de Componentes Principais gerou-se o Figura 2, que apresenta a PC1 x PC2.

Figura 2. Scores das duas primeiras componentes principais para as amostras de cervejas artesanais. PC1 explica 72,67% da variância total dos dados, enquanto a PC2 explica 24,32%.

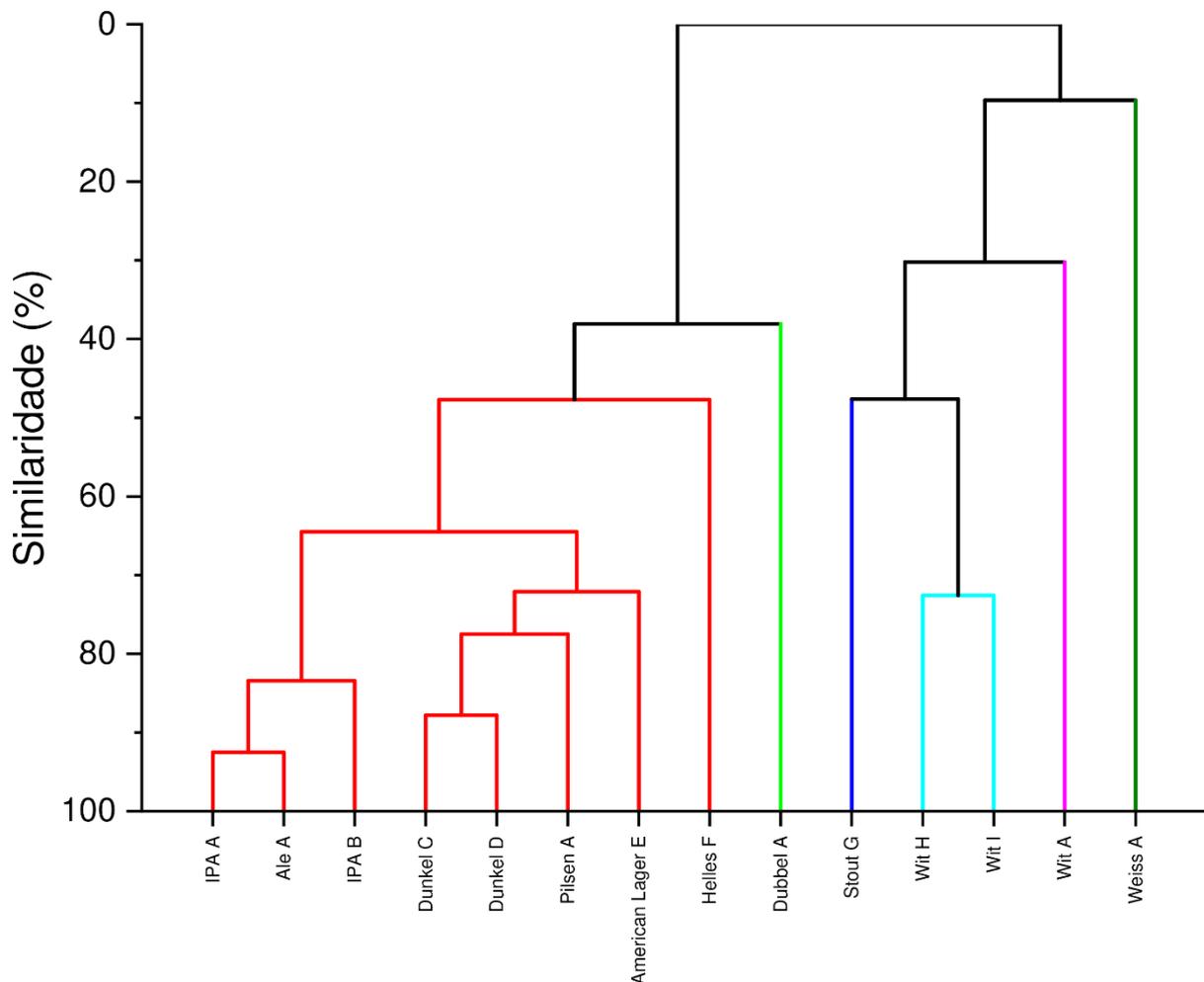


Fonte: Autores.

Observa-se pelo eixo da PC1 que as cervejas que ficaram à direita no eixo X, apresentaram altas concentrações dos álcoois n-propanol e isoamílico e todas elas são cervejas de alta fermentação, do tipo Ale, que são conhecidas por apresentar certas especificidades considerando seus estilos.

A partir da análise hierárquica de cluster, gerou-se o Figura 3 que também apresenta uma tendência de agrupar as amostras segundo a similaridade de seus estilos. Nesse método, a distância entre dois clusters é calculada como a distância média entre todos os pares de objetos nos diferentes clusters.

Figura 3. Dendrograma resultante do método de cluster através da média do grupo (distância euclidiana).



Fonte: Autores.

O dendrograma apresentado no gráfico acima permite observar agrupamentos entre as cervejas India Pale Ale e Ale com aproximadamente 85% de similaridade. No bloco das cervejas Dunkel, constam cervejas as Pilsen e American Lager, todas estilo Lager.

No outro grande bloco observamos o conjunto das cervejas especiais, que conforme já mencionado, são as que ou levam trigo, ou especiarias, ou altos teores de lúpulo torrado, (Brewers Association, 2020) mas com baixa % de similaridade entre elas.

Diante desses resultados, fica evidente a dificuldade em se classificar cervejas artesanais, principalmente porque cada receita é única, mesmo quanto a cerveja deriva de um determinado estilo, seja de origem ou de rota fermentativa.

Dessa forma, sem dúvida, a inovação em produtos é de extrema relevância para o mercado cervejeiro e vai ao encontro do que o consumidor do segmento de cervejas artesanais demanda, principalmente no que se refere a cervejas de qualidade com novos sabores e

aromas. No entanto, a partir do imenso portfólio de cervejas artesanais disponível, não é simples prever todas as características a serem encontradas em uma cerveja, considerando seu estilo ou origem. O que se tem observado é uma variedade de cervejas que atendem às legislações, mas que apresentam propriedades únicas.

Assim, o controle analítico de um determinado produto é a única forma não empírica de se compreender melhor as características deste, garantindo qualidade e segurança ao consumidor. Nesse contexto, o método apresentado se coloca como uma boa alternativa às cervejarias que tem intenção de inovar com qualidade.

4. Considerações Finais

Por meio deste trabalho constata-se que a técnica de cromatografia gasosa com amostragem por *headspace* é uma boa ferramenta para determinação de compostos voláteis em cervejas artesanais.

Foi possível quantificar acetaldeído, acetato de etila, n-propanol, isobutanol e álcool isoamílico em cervejas de diferentes estilos e observou-se a influência dos álcoois superiores na classificação de algumas cervejas específicas, por estarem presentes nestas em altas concentrações.

Diante de tantas inovações nesse seguimento de mercado, com inúmeras variações nas receitas das diferentes cervejas, fica clara a importância da realização de um controle analítico mais rigoroso nesse tipo de produto. As interações e reações (químicas e bioquímicas) envolvidas no processo de produção da cerveja e a complexidade que a cerveja artesanal apresenta, pode afetar a bebida de inúmeras formas, incluindo o padrão de identidade e qualidade o estabelecido pela legislação.

Referências

Anderson, H. E., Santos, I. C., Hildenbrand, Z. L., & Schug, K. A. (2019). A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. *Analytica Chimica Acta*, 1085, 1-20.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). (2019). Norma operacional nº 1, de 24 de janeiro de 2019. Norma interna DIPOV/SDA nº 01, de 24 de

janeiro de 2019. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, ISSN 1111-1111, 3(1.22).

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA). (2020). Anuário da Cerveja 2019. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/SDA, 16.

Brewings Associaton. (2020). *2020 Brewers Association Beer Style Guidelines*. Recuperado de <https://www.brewersassociation.org/edu/brewers-association-beer-style-guidelines/>.

Buiatti, S. Beer Composition: An Overview. (2009). In: Preedy, V. R., (Ed.) *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press, 213–225.

Cecchi, H. M. (2003). *Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos*. Editora UNICAMP.

Cervbrasil. Associação Brasileira Da Indústria Da Cerveja. (2018). *Mercado cervejeiro*. Recuperado de http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/mercado-cervejeiro.

Collins, C. H., Braga, G. L., & Bonato, P. S. (2006). *Fundamentos de Cromatografia*, Editora da Unicamp.

Chen, E. C. H. (2018). Analysis of Volatile Beer Flavor Compounds by a Dynamic Headspace Entrainment Technique. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 41(1), 28-31.

Costa, L. M. R. (2017). Produção de cerveja artesanal pela fermentação de uma levedura da Jaboticaba: Análise da cinética local de metabólitos voláteis e dos efeitos das variáveis no processo. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Cruwys, J., Dinsdale, R. M., Hawkes, F. R., & Hawkes, D. L. (2002). Development of a static headspace gas chromatographic procedure for the routine analysis of volatile fatty acids in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 945(1-2), 195-209.

Daniells, S. (2018). *Brazil ranked number 2 most innovative craft beer Market: Mintel*. Recuperado de <https://www.foodnavigator-latam.com/Article/2018/09/21/Brazil-ranked-number-2-most-innovative-craft-beer-market-Mintel#>.

Equipe Estatcamp. (2014). Software Action. Estatcamp - *Consultoria em estatística e qualidade*, São Carlos - SP, Brasil. Recuperado de <http://www.portalaction.com.br/>.

Gomes, W. P. C., Yoshinaga, F., & Bortoleto, G. G. (2020). Determinação de Álcoois em Bebidas Comerciais por Cromatografia Gasosa e Amostragem por *Headspace*. *Bioenergia em Revista: Diálogos*, 10(1), 111-124. Recuperado de <http://www.fatecpiracicaba.edu.br/revista/index.php/bioenergiaemrevista/article/view/371/373782>.

Hammer, O., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9.

Instituto Adolfo Lutz. (2008). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. Instituto Adolfo Lutz, 1020.

Kobayashi, M., Shimizu, H., & Shioya, S. (2008). Beer Volatile Compounds and Their Application to Low-Malt Beer Fermentation. *Journal Of Bioscience And Bioengineering*, 106(4), 317-323.

Kolb, B., & Ettre, L. S. (1997). *Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice*. Wiley-VCH.

Mainardi, P. H., & Bidoia, E. D. (2020). Modelos Estatísticos Fatoriais: Conceitos e Aplicações. *Exatas Online*, 11(1), 32-49.

Mega, J. F.; Neves, E.; Andrade, C. J. de. (2011) A produção da cerveja no Brasil. *Revista Citino - Ciência, Tecnologia, Inovação e Oportunidades*, Joinville, 1(1), 34-42.

Mosher, M., & Trantham, K. (2017). *Brewing Science: A Multidisciplinary Approach*. Springer.

Nascimento, R. F. do, Lima, A. C. A. de, Barbosa, P. G. A., & Silva, V. P. A. da. (2018). *Cromatografia gasosa: aspectos teóricos e práticos*. Imprensa Universitária, 334.

Preddy, V. R. (Ed.). (2009). *Beer in Health and Disease Prevention*. Academic Press.

Pires, E., & Brányik, T. (2015). *Biochemistry of Beer Fermentation*. Springer.

Reed, G., & Nagodawithana, T. W. (1991). *Yeast Technology*. Springer, 454.

Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collins, C. H., Jardim, I. C. S. F., & Melo, L. F. C. (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 27(5), 771-780.

Ruppel, T., Grecsek, H., & Life, P. (2005). Brewing QC Applications Using Headspace Sampling-Gas Chromatography. *Beer, Grain and Wine*, 28. Recuperado de https://www.perkinelmer.com.cn/PDFs/downloads/FAR_GCBrewingQCApplications.pdf.

Ruvalcaba, J. E., Durán-Guerrero, E., Barroso, C. G., & Castro, R. (2019). Development of a stir bar sorptive extraction method to study different beer styles volatile profiles. *Food Research International*, 126, 108680.

Originpro. Version 2019b. (2019). *OriginLab Corporation*, Northampton, MA, USA. Recuperado de <https://www.originlab.com/>.

Silveira, F. L. da. (2010). *Energia mecânica e calor*. Centro de Referência para Ensino de Física - CREF, Instituto de Física da UFRGS. Recuperado de <https://www.if.ufrgs.br/novocref/?contact-pergunta=energia-mecanica-e-calor>.

Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2017). *Fundamentos de Química Analítica* (9a ed.). Cengage Learning.

Soares, L. M. V. (2001). Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 60(1), 79-84.

Strong, G., & England, K. (2015). BCJP - Beer Judge Certification Program 2015 Style Guidelines. Recuperado de https://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf.

Tian, J. (2010). Determination of several flavours in beer with headspace sampling–gas chromatography. *Food Chemistry*, 123(4), 1318–1321.

Troilo, A., Francesco, G. de, Marconi, O., Sileoni, V., Turchetti, B., & Perretti, G. (2019). Low Carbohydrate Beers Produced by a Selected Yeast Strain from an Alternative Source. *Journal Of The American Society Of Brewing Chemists*, 78(1), 80-88.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Gisele Gonçalves Bortoleto – 50\%

Winston Pinheiro Claro Gomes – 50%