



ANDRESSA APARECIDA GONÇALVES

**APLICAÇÃO DE SPME E GC-MS PARA A DETERMINAÇÃO
DE *OFF-FLAVOURS* E FTALATOS EM CERVEJAS
INDUSTRIAIS E CASEIRAS**

LAVRAS - MG

2021

ANDRESSA APARECIDA GONÇALVES

APLICAÇÃO DE SPME E GC-MS PARA A DETERMINAÇÃO DE *OFF-FLAVOURS* E FTALATOS EM CERVEJAS INDUSTRIAIS E CASEIRAS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química, área de concentração em Química, para a obtenção do título de Doutora.

Prof^o. Dr^o. Márcio Pozzobon Pedroso
Orientador

LAVRAS-MG

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Gonçalves, Andressa Aparecida.

Aplicação de SPME e GC-MS para a determinação de *off-flavours* em cervejas industriais e caseiras / Andressa Aparecida Gonçalves. - 2021.

94 p. : il.

Orientador(a): Márcio Pozzobon Pedroso.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.
Bibliografia.

1. Cerveja. 2. Off-Flavours. 3. Desreguladores Endócrinos. I. Pedroso, Márcio Pozzobon. II. Título.

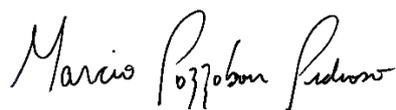
ANDRESSA APARECIDA GONÇALVES

APLICAÇÃO DE SPME E GC-MS PARA A DETERMINAÇÃO DE *OFF-FLAVOURS* E FTALATOS EM CERVEJAS INDUSTRIAIS E CASEIRAS

APPLICATION OF SPME AND GC-MS FOR THE DETERMINATION OF OFF-FLAVOURS AND PHTHALATES IN INDUSTRIAL AND HOMEMADE BEERS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química, área de concentração em Química, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 09 de dezembro de 2021.
Dr. Cleiton Antônio Nunes UFLA
Dr. Leandro Wang Hantao UNICAMP
Dr. Mário Cesar Guerreiro UFLA
Dr^a. Miriany Avelino Moreira Fernandez UFLA



Prof^o. Dr^o. Márcio Pozzobon Pedroso
Orientador

LAVRAS-MG

2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, por mais essa obra realizada em minha vida.

Aos meus pais Sônia e Nadir, minhas irmãs Jussara e Clarissa pelo amor, apoio, incentivo e confiança no meu potencial (mesmo quando eu não confiei). Pelos desdobramentos que todos fizeram, em especial a Clarissa, para “cobrir” a minha ausência nas dificuldades familiares (que não foram poucas) enfrentadas ao longo deste tempo, para que eu pudesse continuar e concluir esta etapa, porque aprendemos desde pequenas, que “podem te tirar tudo nesta vida, menos o conhecimento”. Por nunca me deixarem desistir e compreenderem minhas inconstâncias emocionais.

À minha sobrinha Laura, que trouxe luz e mesmo sem falar nada me fortaleceu para concluir esta etapa, aliás, agora já é uma tagarela e adora ficar no “estudador”.

À Letícia, que me acompanhou em toda esta caminhada, me ensinando além da parte acadêmica, diante do seu comprometimento com a excelência de todos ao seu redor. Obrigada pela sua disponibilidade constante, companheirismo (acadêmico e culinário) e alicerce nos momentos de fraquezas.

Às minhas eternas amigas, Annelise e Dayana, obrigada por tornar essa caminhada mais gostosa, leve e divertida, apesar da distância física.

Às colegas de república Ana e Lara, que tornaram a vida em Lavras agradável e me ensinaram a fazer um verdadeiro churrasco goiano. Obrigada pelos momentos de lazer e “relaxamento” do stress gerado pela vida acadêmica.

Aos colegas do laboratório de pesquisa em química analítica, obrigada por toda colaboração e ensinamentos.

Aos colegas do laboratório de catálise ambiental, que me receberam com tanto carinho e me aceitaram como “agregada”, em especial ao André, Paloma, Pricila e Sibebe, que tornaram a minha passagem em Lavras inesquecível e divertida.

Ao orientador Márcio pela oportunidade oferecida e por toda orientação. Por ser exemplo claro de que a humanidade não impede a excelência profissional e sim a engrandece graciosamente. Pelos ensinamentos incríveis e pela compreensão com as minhas limitações acadêmicas. Você é fonte de inspiração!

Às técnicas Lidy e Fran, que fazem do CAPQ um ambiente de aprendizado constante. Obrigada pela disponibilidade, colaboração, atenção, ensinamentos e confiança.

Ao André e Leandro pela disponibilidade da realização de análises no Instituto de Química da UNICAMP, mesmo em meio ao cenário pandêmico caótico vivido, com total comprometimento e colaboração, viabilizando a finalização deste trabalho.

Aos professores doutores membros da banca, Cleiton, Leandro, Marcelo, Márcio, Mário, Miriany e Stanislau pela disponibilidade de avaliação do trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, ao programa PPGMQ-MG e ao Departamento de Química (professores e funcionários) pela oportunidade oferecida.

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

À FAPEMIG pelos recursos fornecidos.

Aos professores que contribuíram para a minha formação superior, iniciada na Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri e sequenciada na Universidade Federal de Lavras.

À todas as pessoas que me acompanharam e contribuíram de alguma forma para a conclusão deste trabalho. Obrigada.

RESUMO

A qualidade da cerveja pode ser determinada pelos atributos organolépticos, tais como aroma, sabor, brilho e transparência, formação e estabilidade da espuma. Vários fatores podem comprometer essa qualidade durante o seu processo de fabricação, sejam eles inerentes ao próprio processo ou à aspectos microbiológicos. Durante a produção da cerveja também ocorre a formação de compostos como ésteres, ácidos e álcoois superiores, que, em determinadas concentrações, são prejudiciais à qualidade da cerveja, sendo chamados de *off-flavours*. Além disso, com o aumento da produção da cerveja caseira, as quais podem ser produzidas sem os equipamentos adequados para fins alimentícios, surge uma preocupação quanto à saúde humana devido a possível presença de contaminantes na cerveja, como os ésteres do ácido ftálico, ou ftalatos que são desreguladores endócrinos com potencial carcinogênico, que podem ser provenientes de materiais plásticos utilizados durante a produção, armazenagem ou até mesmo das matérias primas utilizadas. Neste trabalho, foi empregada a microextração em fase sólida por headspace cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (HS-SPME-GC-MS) para o desenvolvimento de uma metodologia para a determinação simultânea de *off-flavours* em cervejas industriais e caseiras. A metodologia para determinação de *off-flavours* foi otimizada, validada e aplicada na análise de cervejas industriais e caseiras, sendo observado a presença de ácido butanóico e ácido isovalérico em 3 e 4 cervejas, respectivamente, isobutanol e álcool isoamílico em 15 cervejas e acetato de etila e ácido octanóico em todas as cervejas analisadas. A metodologia para a determinação de cinco ftalatos em cerveja industrial e caseira, foi otimizada, validada e aplicada para análise de 33 cervejas brasileiras envasadas em diferentes recipientes (lata, plástico e vidro). Com isso, foi observada a presença de ftalatos em 48% das amostras. Através desse estudo não foi possível precisar a origem exata dos ftalatos nas cervejas, contudo, 81% das cervejas caseiras apresentaram ftalatos, com concentração de até $182 \mu\text{g L}^{-1}$ e apenas 31% das cervejas industriais apresentaram ftalatos. As amostras de cervejas caseiras apresentaram maior quantidade de ftalatos, provavelmente devido ao uso de material não destinado a fins alimentícios ao longo do processo.

Palavras-chave: Cerveja, *off-flavours*, desreguladores endócrinos, HS-SPME, GC-MS

ABSTRACT

Beer quality can be determined by organoleptic attributes, such as aroma, flavor, brightness and transparency, foam formation and stability. Several factors can compromise this quality during the brewing process, whether they are inherent to the process itself or to microbiological aspects. During beer production there is also the formation of compounds such as esters, acids, and higher alcohols, which, in certain concentrations, are harmful to beer quality, and are called off-flavors. Moreover, with the increase in home brewing, which can be produced without the proper equipment for food purposes, there is a concern about human health due to the possible presence of contaminants in beer, such as phthalic acid esters, or phthalates, which are endocrine disruptors with carcinogenic potential, which may come from plastic materials used during production, storage, or even from the raw materials used. In this work, solid-phase microextraction by headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) was used to develop a methodology for the simultaneous determination of off-flavors in industrial and homemade beers. The methodology for off-flavors determination was optimized, validated and applied in the analysis of industrial and homemade beers, being observed the presence of butanoic acid and isovaleric acid in 3 and 4 beers, respectively, isobutanol and isoamyl alcohol in 15 beers, and ethyl acetate and octanoic acid in all analyzed beers. The methodology for the determination of five phthalates in industrial and home brewed beer was optimized, validated and applied to analyze 33 Brazilian beers bottled in different containers (can, plastic and glass). With this, the presence of phthalates was observed in 48% of the samples. Through this study it was not possible to specify the exact origin of the phthalates in the beers, however, 81% of the homemade beers presented phthalates, with concentrations up to $182 \mu\text{g L}^{-1}$ and only 31% of the industrial beers presented phthalates. The samples of homemade beers showed a higher amount of phthalates, probably due to the use of material not intended for food purposes throughout the process.

Keywords: Beer, off-flavours, endocrine disruptors, HS-SPME, GC-MS

LISTA DE ABREVIATURAS

CAPQ	Central de Análise e Prospecção Química
CAR/DVB	Carboxen/divinilbenzeno
DDC	Delineamento de composto central do inglês <i>Central Composite Design</i>
CI	Ionização química, do inglês <i>Chemical Ionization</i>
CV	Coefficiente de variação
DBP	Dibutil ftalato do inglês <i>Dibutylphthalate</i>
DEHP	Di-2-etilhexil ftalato do inglês <i>Di-2-ethylhexylphthalate</i>
DEP	Dietil ftalato do inglês <i>Diethylphthalate</i>
DiBP	Diisobutil ftalato do inglês <i>Diisobutylphthalate</i>
DMP	Dimetil ftalato do inglês <i>Dimethylphthalate</i>
DOP	Diocetil ftalato do inglês <i>Dioctylphthalate</i>
DPR	Desvio padrão relativo
EI	Ionização por Elétrons do inglês <i>Electron Ionization</i>
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa, do inglês <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i>
HS-SPME	Microextração em fase sólida por <i>headspace</i> do inglês <i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i>
LOD	Limite de detecção do inglês <i>Limit of detection</i>
LOQ	Limite de quantificação do inglês <i>Limit of quantification</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Espectrômetro de Massas do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
PA	Poliacrilato
PCA	Análise de componentes principais
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
PDMS/DVB/CAR	Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno/carboxen
Q	Quadrupolares, do inglês <i>Quadrupole</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
TOF	Tempo de Voo, do inglês <i>Time of Flight</i>
VDK	Dicetonas vicinais do inglês <i>Vicinal Diketones</i>

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	12
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Cerveja.....	15
2.2 Produção das cervejas.....	17
2.2.1 <i>Off-Flavours</i>	19
2.2.2 Ftalatos	22
2.3 Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa	26
2.4 Preparo de amostra	28
2.4.1 Microextração em fase sólida.....	28
2.5 Otimização.....	31
2.6 Validação	32
2.7 Análise dos componentes principais (PCA)	34
CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	35
REFERÊNCIAS	37
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	44
ARTIGO 1	45
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE <i>OFF-FLAVOURS</i> EM CERVEJA	45
POR HS-SPME-GC-MS	45
RESUMO	46
1 Introdução.....	46
2 Materiais e Métodos	48
2.1 Reagentes e amostras.....	48
2.2 HS-SPME e GC-MS.....	49
2.3 Otimização HS-SPME.....	50
2.4 Validação da metodologia	51
3 Resultados e Discussão.....	52
3.1 Otimização.....	52
3.2 Validação	56
3.3 Amostras.....	58
4 Conclusões.....	61
5 Referências Bibliográficas.....	62

ARTIGO 2	65
Otimização e validação de metodologia para determinação de ftalatos por HS-SPME-GC-MS em cervejas caseiras e industriais	65
Resumo	66
1. Introdução	66
2 Materiais e Métodos	69
2.1 Instrumentação.....	69
2.1 Reagentes e amostras.....	69
2.2 HS-SPME e GC-MS	70
2.3 Otimização SPME	71
2.4 Validação da metodologia	72
2.5 Amostras	73
2.6 Análise de PCA	73
3 Resultados e Discussão.....	73
3.1 Otimização.....	73
3.2 Validação	78
3.3 Amostras	80
4 Conclusões.....	86
5 Referências Bibliográficas.....	87

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A fabricação da cerveja representa uma das biotecnologias mais antigas da humanidade, tendo sido descoberta acidentalmente. Acredita-se que um pedaço de pão de centeio estragou e apresentou um aroma e sabor agradável, fruto da fermentação alcoólica, sendo posteriormente misturado na água, gerando a cerveja (SCHABO *et al.*, 2021).

Atualmente, a cerveja pode ser definida como uma mistura complexa, produzida a partir de água, malte, levedura e lúpulo, envolvendo as etapas de moagem, brasagem, fervura, fermentação, maturação, filtração e envase (BRASIL, 2019). É uma das bebidas mais consumidas do mundo sendo produzidas em grande escala por cervejarias industriais. Porém, nos últimos anos vem crescendo a produção de cervejas artesanais, consideradas especiais uma vez que são dotadas de singularidades no sabor e aroma que as diferenciam daquelas produzidas em larga escala.

Considerando a qualidade das cervejas, há uma influência direta dos compostos ativos de aroma e sabor. Estes compostos pertencem a várias classes químicas, incluindo álcoois superiores, ésteres, ácidos graxos de cadeia curta, compostos carbonílicos, compostos de enxofre, terpenos e fenóis voláteis. Esses podem ser provenientes das matérias primas utilizadas; das condições em que são realizadas a produção da cerveja, da formação de fermentação, da presença de microorganismos contaminantes e da estabilidade de compostos durante a armazenagem do produto. Assim, torna-se interessante a determinação destes compostos na cerveja, de modo a caracterizar a qualidade da mesma e realizar modificações necessárias no processo de produção (OLANIRAN *et al.*, 2017).

Além da avaliação da qualidade da cerveja quanto ao perfil organoléptico, a avaliação da presença de contaminantes mostra-se importante considerando a saúde humana. Dentre os contaminantes, estão ésteres do ácido ftálico, ou ftalatos, compostos considerados desreguladores endócrinos e potencialmente carcinogênicos, que são largamente utilizados pela indústria como plastificantes ou adicionados a polímeros. Por estarem ligados fisicamente ao polímero, os ftalatos podem facilmente migrar dos materiais plásticos para os alimentos ou bebidas em contato. Na cerveja esta contaminação pode ser proveniente dos materiais plásticos utilizados durante a

produção e das embalagens plásticas (*growlers*) usadas para armazenagem e transporte da cerveja ou chope, cuja utilização aumentou muito nos últimos anos ou até mesmo da própria matéria prima utilizada (CARNOL *et al.*, 2016).

A determinação simultânea de diferentes grupos de compostos, como é o caso dos *off-flavours* e dos ftalatos, em uma amostra complexa como a cerveja é uma tarefa difícil, mas pode ser realizada utilizando a técnica de Microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME, do inglês *Headspace Solid-Phase Microextraction*) como preparo de amostra. Essa técnica dispensa o uso de solventes de extração, proporciona a extração dos analitos da matriz, a eliminação de interferentes inviáveis para análise e concentra os analitos em uma única etapa. Após a etapa de preparo de amostra, a análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) pode ser realizada para a separação, identificação e quantificação desses compostos. Assim, uma metodologia HS-SPME-GC-MS pode ser utilizada para a determinação de compostos que conferem aroma/sabor desagradável à cerveja (denominados *off-flavours*) e para a determinação de ftalatos.

Para determinar esses compostos a partir das técnicas de HS-SPME e GC-MS deve-se considerar as condições que garantam melhor sensibilidade, precisão, exatidão e recuperação. Para isso, pode ser realizada uma otimização multivariada da extração por HS-SPME através de um planejamento experimental, possibilitando a determinação da melhor condição de extração por meio da variação do tempo de extração, tempo de dessorção, do pH das soluções, da temperatura de extração e adição de sal, garantindo que sejam consideradas todas as interações das variáveis.

Diante disso, ao longo desse trabalho, buscou-se empregar as técnicas de HS-SPME e GC-MS para a determinação de compostos de interesse em cervejas industriais e caseiras, de diferentes estilos. Nesse sentido, foi otimizada e validada uma metodologia para determinação de *off-flavours* em cervejas convencionais e especiais, produzidas industrialmente por grande ou micro cervejarias e por cervejeiros caseiros. Outra metodologia foi otimizada e validada para a determinação de ftalatos em cervejas envasadas em recipientes de diferentes materiais (lata, plástico e vidro) e com produção industrial e caseira. A cerveja se apresenta como uma matriz de interesse para estudos, pois é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas do mundo. Além disso, tem sido observado o intenso crescimento da produção de cervejas consideradas artesanais, aquelas em que o sabor e aroma são características de extrema importância para o

consumidor. Em complemento, a produção caseira de cerveja aumentou bastante no Brasil, sendo que não há nenhuma informação sobre a qualidade dessa cerveja.

Assim, este trabalho de tese está dividido em duas partes, na primeira parte contém Introdução, Objetivos, Referencial Teórico e Considerações Gerais e na segunda parte dois artigos desenvolvidos, Artigo 1 e Artigo 2.

O Artigo 1, apresenta uma metodologia baseada em HS-SPME-GC-MS para a determinação de *off-flavours* em cervejas convencionais, artesanais e caseiras, diante da preocupação da qualidade da cerveja produzida e direcionada ao consumo.

O Artigo 2, apresenta uma metodologia baseada em HS-SPME-GC-MS para a determinação de ftalatos, devido à preocupação com saúde humana, uma vez que, estes são desreguladores endócrinos e prejudiciais aos humanos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cerveja

Segundo a Instrução Normativa n° 65 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) publicada em 11 de dezembro de 2019 “a cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro”.

Segundo o MAPA, em 2019 o número total de cervejarias legalmente instaladas no Brasil atingiu a marca de 1209, incluindo as grandes cervejarias com produção em massa e as pequenas e médias cervejarias. Essas, em grande parte, têm como objetivo atender consumidores que visam maior qualidade e diferenciação do produto, com processo e formulações distintos das grandes empresas cervejeiras, produzindo cervejas diferenciadas, que nesse trabalho serão denominadas de “cervejas especiais”. Tradicionalmente, as grandes cervejarias brasileiras sempre produziram cervejas pertencentes à família *Lager*, gerando cervejas leves, pouco amargas e de baixo teor alcoólico pertencentes aos estilos *Pilsen* ou *American Lager*, denominadas neste trabalho como cervejas convencionais. Entretanto, devido ao grande interesse do consumidor pelas cervejas especiais, as grandes cervejarias iniciaram a fabricação e comercialização das mesmas, uma vez que não existe legislação específica e diferenciada para definir ou regulamentar a sua produção e comercialização (MAPA, 2019).

As cervejas convencionais são produzidas em grande escala de modo a alcançar o maior número de consumidores com o menor custo possível. Para alcançar esse objetivo, aceleram os processos de fermentação e maturação com produtos químicos, a fim de reduzir o tempo de produção, baixando os custos de produção. Além disso, utilizam receitas que admitem em sua composição 55% de malte e 45% de outros adjuntos cervejeiros, como milho, arroz e outros cereais não maltados, além de carboidratos, antioxidantes e estabilizantes (BRASIL, 2019).

Já as cervejas denominadas especiais, mas também chamadas de artesanais ou *gourmet*, são produzidas em pequena escala, focando na qualidade sensorial do produto. Sua produção é feita com uma maior quantidade de malte e lúpulo quando comparada às cervejas convencionais, os ingredientes são mais nobres e selecionados. Além disso,

ingredientes não tradicionais podem ser adicionados, proporcionando sabores e aromas variados, como frutado, chocolate, café e ervas, atendendo a diferentes paladares. Em complemento, algumas cervejarias não pasteurizam a sua produção para manter aromas e sabores, o que faz com que o produto seja mantido sob refrigeração ao longo de toda cadeia de produção. Como consequência, o custo para a produção da cerveja especial é mais elevado do que para as cervejas convencionais, interferindo diretamente no preço final, que em média é o dobro ou o triplo que o valor das cervejas convencionais (SCHABO *et al.*, 2021).

Por muito tempo o mercado cervejeiro foi dominado pelas grandes cervejarias com a produção das cervejas *lager*, porém nos últimos anos houve uma mudança no mercado com o crescimento das cervejas denominadas artesanais, especiais ou *gourmet*, como uma alternativa para suprir o perfil organoléptico leve das cervejas convencionais. No Brasil as cervejas especiais são produzidas em pequena escala, focando na qualidade do produto. Já em países do hemisfério norte, as cervejarias produzem em grande escala cervejas com fermento *Ale*, as quais são mais encorpadas e com mais aroma/sabor, como as cervejas dos estilos *American Pale Ale*, *IPA* e *Stout*, que no Brasil são consideradas especiais, pois são estilos diferentes dos tradicionalmente produzidos aqui pelas grandes cervejarias (SCHABO *et al.*, 2021).

As cervejas, *Ale* e *Lager*, recebem esta denominação de acordo com o tipo de fermentação utilizado durante a produção. Para a produção das cervejas *Ale* é utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em temperaturas que variam entre 18 °C e 25 °C, também conhecida como leveduras de alta fermentação, uma vez que as leveduras tendem a ficar na superfície do mosto durante a fermentação e decantando ao final. Este tipo de fermentação produz cervejas com sabores frutados e florados, o que se deve as contribuições de ésteres e álcoois superiores formados durante a fermentação. Já na produção das cervejas *Lagers* é utilizada a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* em temperaturas que variam entre 6 °C e 15 °C, também conhecidas como leveduras de baixa fermentação, produzindo cervejas aromaticamente mais leves e suaves, com menor concentração de ésteres, por causa da baixa temperatura de fermentação utilizada, mas podendo apresentar leves notas de enxofre derivado da levedura (CAPECE *et al.*, 2018; LORENCOVÁ *et al.*, 2019; RUVALCABA *et al.*, 2019). Além do tipo de levedura usada na fermentação, as cervejas *Ale* geralmente possuem uma carga de lúpulo maior que as cervejas *Lager*.

2.2 Produção das cervejas

As principais matérias primas utilizadas na produção das cervejas são as leveduras citadas anteriormente, a cevada (GONÇALVES *et al.*, 2014), o lúpulo (ALMEIDA; AGUIAR; CARDOSO, 2015) e a água (SANTOS; CARASEK, 2013).

A cevada (*Hordeum vulgare*) é um grão fonte de amido, proteínas e enzimas citolíticas, proteolíticas e amilolíticas, que são necessárias para a produção eficiente de mosto rico em enzimas α -amilase e β -amilase (GONÇALVES *et al.*, 2014). O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma trepadeira perene que contém uma grande quantidade de óleos essenciais, α -ácidos e β -ácidos presentes em suas flores, os quais são de interesse das cervejarias, uma vez que conferem aromas e sabores diferenciados às cervejas produzidas. Os terpenos são os principais constituintes do óleo essencial de lúpulo, sendo os responsáveis pelo típico aroma de lúpulo na cerveja, porém são compostos que sofrem oxidação facilmente podendo gerar propriedades organolépticas desagradáveis (ALMEIDA *et al.*, 2015).

A produção da cerveja inclui as seguintes etapas principais: germinação, moagem, brasagem, fervura, fermentação, maturação, filtração e envase. Na moagem o malte é triturado de modo que ocorra a ruptura da casca e exposição do material amiláceo. Além da exposição do amido, a casca do malte moído servirá como um filtro natural de impurezas, dado que não tenha sido extensivamente triturado. Em seguida os grãos são misturados em água aquecida, na etapa denominada brassagem, onde efetivamente ocorre a fragmentação do amido em açúcares fermentáveis, como a glicose, maltose e a maltriose, pela ação enzimática da beta e alfa amilase nativas do grão, conservadas pela maltagem da cevada. Após o fim desta etapa, o mosto obtido, que tem caráter adocicado por conta dos açúcares presentes, é aquecido a 76-78 °C para inativação enzimática (PASCARI *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2017).

A etapa seguinte é a fervura onde são adicionados lúpulos para a atribuição do amargor, que ocorre por meio da conversão de α -ácidos em iso- α -ácidos, e aroma, por meio da solubilização dos óleos essenciais do lúpulo. Durante essa etapa também ocorre a coagulação e precipitação das proteínas, a esterilização do mosto de atividades microbiológicas indesejadas e a eliminação de compostos voláteis indesejados, como o dimetilsufeto. Contudo a retirada de voláteis não é seletiva, causando um impacto negativo no aroma da cerveja, por retirar os compostos de interesse inerentes ao óleo essencial do lúpulo. Em seguida, o mosto é filtrado, eliminando resíduos que podem

interferir na qualidade da fermentação, resfriado e direcionado para a fermentação (PASCARI *et al.*, 2018).

Na fermentação ocorre a atribuição de uma característica essencial da bebida, o grau alcoólico. A levedura adicionada ao mosto proporciona a conversão dos açúcares em dióxido de carbono e etanol, além de uma variedade de produtos secundários como ésteres, ácidos carboxílicos e álcoois superiores. As leveduras que fermentam o mosto também geram compostos importantes para o aroma da cerveja. Entretanto, o dióxido de carbono produzido durante a fermentação retira parte dos voláteis associados ao lúpulo e à levedura, os quais são responsáveis pelo aroma da cerveja, tendo um impacto negativo no aroma da bebida. Estes compostos proporcionam as propriedades organolépticas à cerveja, por isso, a fermentação é considerada a fase mais importante do processo para definir o paladar da cerveja, sendo necessário controlar as condições envolvidas nesta etapa, incluindo taxa de inoculação, temperatura, extensão da adição de oxigênio, razão C:N duração da fermentação e maturação (BOKULICH; BAMFORTH, 2013; PASCARI *et al.*, 2018).

As etapas previamente descritas são obrigatórias na produção da cerveja, ou seja, para o produto almejado ter as características inerentes a bebida ele necessariamente precisa passar pelas etapas explicitadas. No entanto, há etapas adicionais e opcionais, como a maturação onde a cerveja é armazenada a baixa temperatura durante um determinado período, para que ocorra a precipitação de leveduras e a formação/estabilização do sabor do produto final. Durante essa etapa também pode ser realizada a inserção e/ou a intensificação do aroma de lúpulo da cerveja, por meio da utilização de lúpulo em temperaturas destinadas a fixação de seus voláteis, denominado de *dry hopping* (PASCARI *et al.*, 2018).

As cervejas convencionais maturadas passam por uma segunda filtração e as cervejas envasadas são pasteurizadas para eliminar microorganismos, enquanto as cervejas artesanais normalmente não são filtradas e/ou pasteurizadas. Assim, as cervejas especiais estão mais suscetíveis à contaminação quando comparada as cervejas convencionais (SCHABO *et al.*, 2021).

O processo de produção da cerveja influencia diretamente no perfil organoléptico do produto final, sendo a principal diferença entre as cervejas convencionais e especiais. A qualidade da cerveja pode ser determinada pela preservação da estabilidade sensorial, que se tornou então o parâmetro de qualidade mais importante para as cervejarias, determinado pela presença de *flavours*.

Diante disso, para avaliar a qualidade da cerveja, pode-se determinar e quantificar os *flavours* presentes que caracterizam o sabor e aroma da cerveja.

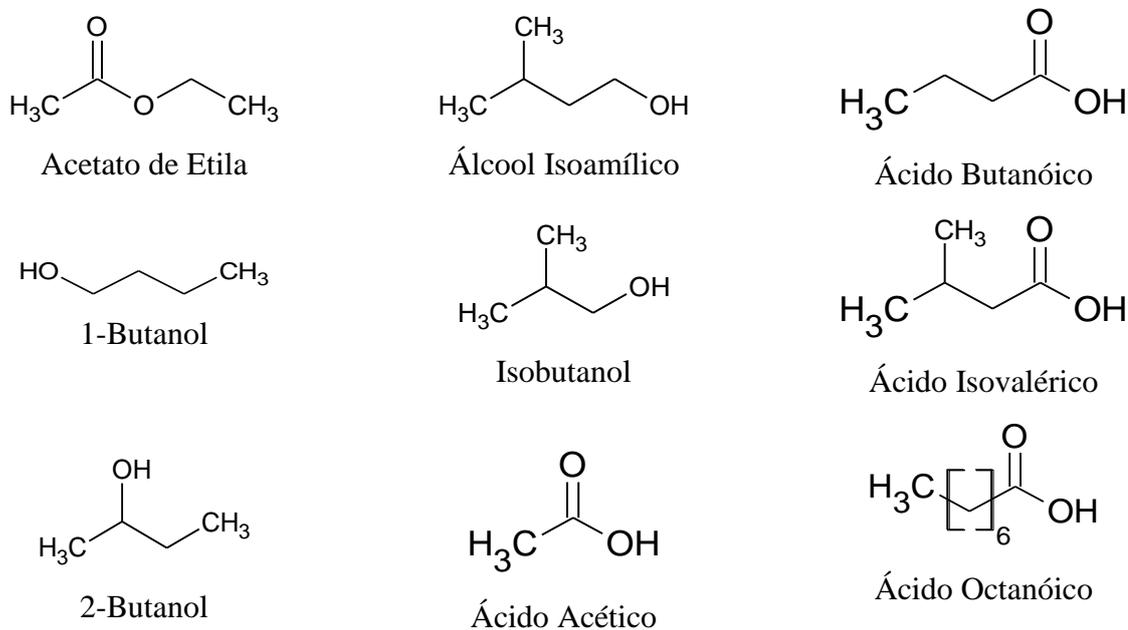
2.2.1 Off-Flavours

Os *flavours* são compostos que influenciam no sabor/aroma da cerveja ou apenas contribuem na construção do sabor de fundo da cerveja, podendo ser desejáveis ou indesejáveis, e presentes em diferentes níveis de concentração (MA *et al.*, 2016). Eles podem ser originários de diversas fontes e em diferentes etapas do processo de produção da cerveja, como da matéria-prima utilizada, incluindo os ingredientes adicionados para agregar sabor e aroma e das condições de armazenamento; das condições das etapas de mosturação, fermentação e armazenamento; dos tipos de materiais utilizados nos equipamentos de produção e envase (CALLEJON *et al.*, 2016; BUDNER *et al.*, 2021; TROVATO *et al.*, 2021). Dentre os *flavours*, alguns compostos são denominados *off-flavours*, pois a sensação gerada a partir do aroma e do sabor normalmente não está associada ao alimento (PORTEA; PORTEB; OLIVEIRA, 2014).

Estudos relatam a presença de *off-flavours* em cervejas (STEFANUTO *et al.*, 2017), em frutas (BRAGA *et al.*, 2015; FONSECA *et al.*, 2008); licores (NIU *et al.*, 2017); chás (SASAKI *et al.*, 2017); água (CALLEJÓN *et al.*, 2016) e vinhos (BOUTOU; CHATONNET, 2007; HORLACHER; SCHWACK, 2016; SCHMARR; KEISER; KRAUTWALD, 2016).

No caso das cervejas, a presença de *off-flavours* pode contribuir negativamente para a qualidade do produto final dependendo da concentração presente em um determinado estilo de cerveja e, portanto, é muito importante avaliar a presença e a concentração desses compostos. Compostos como dicetonas vicinais (VDK, do inglês *Vicinal Diketones*) (LEÇA *et al.*, 2015), diacetil, pentanodiona, acetona e acetaldeído (TIAN, 2010), acetato de etila, acetato de isoamila e hexanoato de etilo (DA SILVA *et al.*, 2015), benzaldeído (CASTRO; ROSS, 2015), e (E)-2-nonenal (SAISON *et al.*, 2008) são caracterizados como *off-flavours*. Assim como os produtos secundários, como ésteres (acetato de etila, acetato de isoamila), ácidos (acético, butanoico, octanóico e isovalérico) e álcoois superiores (amílico, o 2-Butanol, 1-Butanol, Isobutanol e Isoamílico). As estruturas do acetato de etila, ácidos (acético, butanoico, octanóico e isovalérico) e álcoois superiores (amílico, o 2-Butanol, 1-Butanol, Isobutanol e Isoamílico) estão apresentadas na Figura 1 e são os compostos estudados neste trabalho.

Figura 1 — Estrutura dos *off-flavours* Acetato de etila, Ácidos (Acético, Butanóico, Octanóico e Isovalérico) e Álcoois superiores (Amílico, 2-Butanol, 1-Butanol, Isobutanol e Isoamílico)



Fonte: Do Autor (2021).

O acetato de etila está presente em todas as cervejas e em baixas concentrações fornece um sabor frutado de pera à cerveja, mas em altas concentrações pode provocar um sabor de solvente ou acetona. O acetato de etila é proveniente da esterificação dos álcoois e ácidos graxos ativados pela co-enzima A e no caso de formação de acetatos, a enzima Acetato Transferase catalisa a esterificação. Observa-se que nas cervejas *Lagers*, nas quais a fermentação é realizada em temperaturas mais baixas, a presença de acetato é menor, enquanto que em cervejas *Ale* a presença de acetato de etila é maior, visto que a fermentação ocorre em temperaturas maiores. Isso se deve ao fato de que quanto maior a temperatura de fermentação, mais rapidamente as leveduras crescem e maior quantidade de ésteres serão formados. Sabores que são apropriados e desejáveis em um estilo de cerveja podem ser considerados defeitos em outro estilo, como é o caso do acetato de etila (PIRES *et al.*, 2014).

A presença de acetato de etila nas cervejas está relacionada às condições da fermentação. Assim, de modo a diminuir quantidade de acetato de etila presente nessas bebidas e garantir a qualidade desejada, uma alternativa viável é evitar variações da temperatura ao longo da fermentação (BARTH, 2013; DACK *et al.*, 2017).

Outros compostos importantes no aroma da cerveja são os álcoois superiores, cuja presença é desejável, embora deva ser controlada, pois em concentrações maiores pode tornar-se um revés no sabor e aroma, resultando em um gosto forte de álcool, às vezes sentido como solvente e provocando sensação de queimação. Além disso, os álcoois superiores também fornecem a porção de álcool necessária para a síntese de ésteres desejáveis, que representam um importante grupo de compostos ativos no sabor e aroma da cerveja (DACK *et al.*, 2017).

Os álcoois são formados durante a fermentação como subprodutos, sendo a presença deles na cerveja proveniente da má fermentação, originando um sabor semelhante ao etanol e em concentrações maiores um sabor de solvente, como por exemplo o álcool amílico, o 2-Butanol, 1-Butanol, Isobutanol e Isoamílico.

Ao longo da fermentação, a formação dos álcoois é favorecida em temperatura elevada, baixa taxa de inóculo de leveduras (fermento) e taxa de aeração adequada. Quando há mais substrato de álcool, há uma maior oportunidade de formação de éster com qualquer acetil-CoA presente. Assim, a produção de cervejas com baixo teor de éster é um ato de equilíbrio, uma vez que o controle dos fatores que ajudam a impedir a formação de éster pode favorecer a produção de álcool (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

A presença de ácidos carboxílicos na cerveja pode provocar diferentes aromas. O ácido octanóico é responsável por aromas de sabão e queijo de cabra; o ácido acético fornece um aroma característico de vinagre; o ácido butanóico origina aromas de vômito de criança e leite azedo e o ácido isovalérico um aroma de queijo (HORNINK; GALEMBECK, 2019). Os ácidos são formados durante a fermentação como, por exemplo, pela oxidação do etanol. A presença de ácidos é inevitável e em alguns tipos de cerveja é até aceito em pequenas concentrações, mas na maioria das cervejas, quando em concentração superior ao limiar de percepção, torna-se desagradável. A presença indesejável dos ácidos pode ocorrer devido à má sanitização dos equipamentos, tempo excessivo de mosturação, uso de fermento de baixa vitalidade, má fermentação e armazenamento em altas temperaturas (HORNINK; GALEMBECK, 2019).

Com relação as condições de fermentação, a proporção alta de álcool em relação aos ésteres caracteriza uma fermentação normal. No entanto, pode ocorrer uma proporção de álcool em relação ao éster maior que o esperado, devido a alguns fatores como a intensa aeração no tanque de fermentação, condição que não é desejável, pois resulta na perda das características de sabor. As leveduras de alta fermentação também podem influenciar na proporção entre álcool e éster, produzindo mais ésteres do que

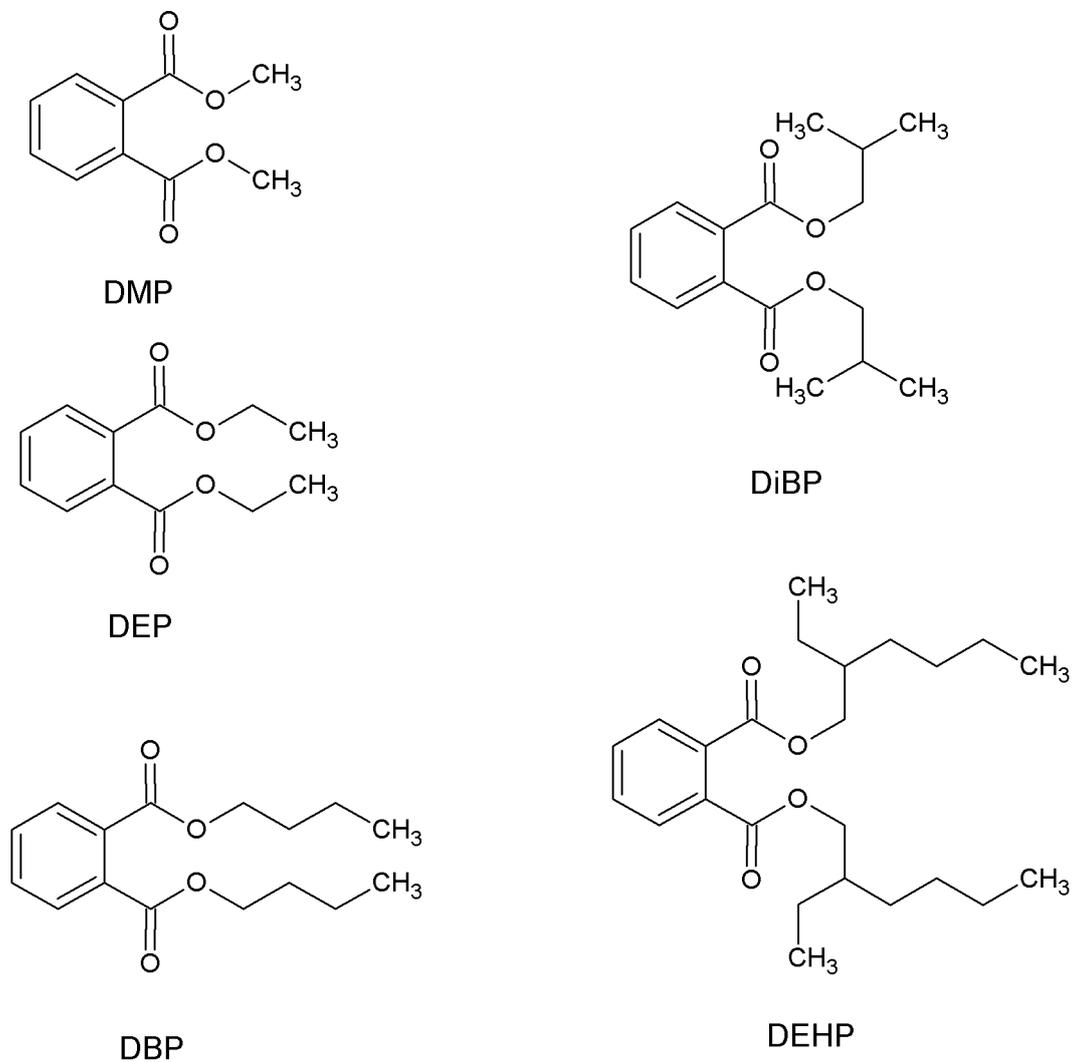
álcoois superiores quando comparadas às leveduras de baixa fermentação. As temperaturas mais altas e a aplicação de pressões maiores em leveduras de alta fermentação favorecem a produção de ésteres. Em cervejas mais fortes são esperadas notas de ésteres e um sabor mais arredondado, enquanto que em cervejas mais leves, a expressão dos álcoois superiores é maior em relação aos ésteres (BARTH, 2013; LIVENS, 2016).

Como esses possíveis produtos e subprodutos de fermentação estão presentes em quantidades significativas ou perceptíveis, a determinação desses compostos auxilia na avaliação da qualidade da cerveja produzida. Assim métodos vêm sendo desenvolvidos para a determinação de alguns flavours e *off-flavours* em cerveja, como por exemplo a HS-SPME-GC-MS, embora não sejam exigidos pelo MAPA para a comercialização das cervejas.

2.2.2 Ftalatos

Os ftalatos são ésteres do ácido ftálico, obtidos a partir da esterificação de ácidos ftálicos com diferentes álcoois. Dessa forma, variados ftalatos podem ser sintetizados, apresentando diferentes propriedades físicas e químicas, que determinam suas aplicações. Com isso, podem-se classificar tais compostos em dois grupos a partir de seu peso molecular. Os ftalatos de baixo peso molecular apresentam cadeia lateral com até quatro carbonos, incluindo o dibutil ftalato (DBP, do inglês *Dibutylphthalate*), diisobutil ftalato (DiBP, do inglês *Diisobutylphthalate*), dietil ftalato (DEP, do inglês *Diethylphthalate*) e dimetil ftalato (DMP, do inglês *Dimethylphthalate*). Já os ftalatos de alto peso molecular possuem na cadeia lateral cinco ou mais carbonos e incluem, por exemplo, o dioctil ftalato (DOP, do inglês *Dioctylphthalate*) e o di-2-etilhexilftalato (DEHP, do inglês *Di-2-ethylhexylphthalate*) (GIULIANI *et al.*, 2020). A Figura 2 apresenta as estruturas dos ftalatos que serão estudados neste trabalho.

Figura 2 — Estrutura dos ftalatos DBP, DiBP, DEP, DMP e DEHP.



Fonte: Do autor (2021).

Os ftalatos são amplamente empregados em aplicações industriais, sendo utilizados como plastificantes ou adicionados aos polímeros a fim de melhorar a flexibilidade e mobilidade dos mesmos, possibilitando diversas aplicações em produtos de consumo à base de plástico, incluindo materiais de construções, brinquedos para bebê, dispositivos médicos, equipamentos eletrônicos, cosméticos e embalagens para alimentos. Uma vez que eles estão apenas fisicamente ligados às cadeias de polímeros,

podem ser liberados em quantidades significativas para o meio ambiente durante seu processo de fabricação, utilização e disposição final (PERESTRELO *et al.*, 2020).

Os ftalatos são considerados desreguladores endócrinos e, em específico o DEHP é classificado como possivelmente carcinogênico para humanos (grupo 2B) pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC). Além disso, por sua persistência ambiental, são considerados poluentes de alto risco por seus impactos negativos ao meio ambiente e aos organismos vivos. A exposição humana ao ftalatos pode ocorrer por inalação, por contato com a pele e por ingestão que é a principal fonte de contaminação de ftalatos em humanos. A contaminação de alimentos e bebidas por ftalatos pode ocorrer facilmente pela migração destes compostos a partir de vários materiais em contato com os alimentos durante a produção, armazenamento e transporte (GIULIANI *et al.*, 2020).

Dada a toxicidade dos ftalatos e o potencial risco à saúde humana a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América “Environmental Protection Agency” / USA – (EPA) fixou a concentração do DEHP em $6 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas acondicionadas em garrafas plásticas, bem como foi proibido o uso de plastificantes tóxicos em brinquedos que vão a boca de crianças

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é a organização governamental destinada a regulamentar, controlar e fiscalizar os produtos e serviços que envolvam risco à saúde pública, dentre eles os recipientes destinados ao contato com alimentos, as instalações físicas e tecnologias envolvidas na produção. Nesse sentido, foram estabelecidas pela ANVISA algumas condições quanto ao uso de plastificantes, a partir da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) a qual está compatibilizada com as resoluções GMC MERCOSUL. A RDC nº105, de 19 de maio de 1999, refere-se a disposições gerais para embalagens e equipamento plásticos em contato com alimentos, limitando o uso do plastificante DEHP em embalagens que entram em contato com alimentos gordurosos a um limite de 3% em massa do plastificante. A RDC nº 91, de 11 de maio de 2001, que diz respeito a critérios gerais e classificação de materiais para embalagens e equipamentos que entram em contato com alimentos, determinando que estes não devam possibilitar a migração de componentes indesejáveis para os alimentos acima dos limites máximos estabelecidos (ANVISA, 2001). A RDC nº 17, de 17 de março de 2008, define uma lista positiva de aditivos para materiais plásticos empregados na fabricação de embalagens e equipamentos que entrem em contato com alimentos. Dentre esses aditivos estão os ftalatos de butila e

benzila, dibutila, dicitlohexila, dietila, diisodecila, di-2-etilexila e dioctila, para os quais são estabelecidos limites e restrições, sendo que para o DEHP o limite de migração é de $1,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ (ANVISA, 2008). Já a RDC nº 56, de 16 de novembro de 2012, estabelece uma lista de monômeros, outras substâncias iniciadoras e polímeros autorizados para a elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. Essa resolução especifica quanto ao ftalato de dibutila, limitando seu uso em embalagens de alimentos a $0,3 \text{ mg kg}^{-1}$ e restringindo sua aplicação em revestimentos em contato com alimentos gordurosos (ANVISA, 2012). A RDC nº51, de 26 de novembro de 2010, dispõe sobre migração em embalagens e equipamentos plásticos destinados a entrar em contato com alimentos. Assim, há permissão para o uso dos ftalatos, entretanto, são estabelecidas algumas restrições de uso e limites de composição e de migração.

A presença dos ftalatos em bebidas alcoólicas, como a cerveja, pode ser proveniente de diferentes fontes, que englobam desde o tipo de matéria prima utilizada e suas condições de armazenagem, passando pela produção (relacionada ao contato com equipamentos a base de materiais plásticos), até o envase (relacionado ao tipo de material utilizado para tal) (CAO, 2010).

Nas cervejas oriundas de cervejarias industriais (grande e micro), a presença desses contaminantes pode ser resultante da utilização de algum tipo de material plástico no envase das mesmas, como, por exemplo, na vedação interna das tampas de alumínio utilizadas nas garrafas de vidro ou em *growlers*, que é um tipo de garrafa introduzido no comércio para proporcionar um produto mais fresco, além de diminuir os custos com garrafa, envasamento e rótulo (CAO 2010; CARNOL 2016) Em relação à presença de ftalatos em cervejas caseiras, não há nenhum estudo que apresente algum resultado. Entretanto, os ftalatos podem estar também presentes nessas amostras por usar o mesmo tipo de tampa de garrafa, além de outras possíveis fontes de contaminação por plásticos, como fermentadores, bombas de sucção, mangueiras e conectores, todos esses em plásticos, os quais podem não ser os mais indicados para uso alimentício. Uma vez que esses equipamentos a base de plástico reduzem os custos em relação aos equipamentos de inox, o seu uso é bem difundido entre os cervejeiros caseiros. Em complemento, há relatos em fóruns da internet nos quais são usadas bombas de circulação de máquina de lavar louça, pulverizadores para fins agrícolas, baldes plásticos reutilizados de diversos tipos de produtos, além de inúmeras adaptações com materiais cuja finalidade não era a produção de cerveja ou de outros alimentos.

Diante da possível presença de contaminantes, como os ftalatos, em cervejas, devido o contato com materiais plásticos, torna-se necessário o desenvolvimento de uma metodologia capaz de detectar estes compostos, como por exemplo, a HS-SPME-GC-MS para avaliar a presença desses contaminantes tanto em cervejas armazenadas em frascos plásticos como em cervejas de fabricação caseira.

2.3 Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa

A GC é a principal técnica de separação para a determinação de compostos voláteis nos mais diversos tipos de amostras e acoplada a um Espectrômetro de Massas (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) permite a separação, identificação e quantificação desses compostos. A GC baseia-se na distribuição dos analitos entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária líquida ou sólida. Os componentes de uma amostra são injetados e vaporizados pelo aquecimento do injetor. A eluição é feita por um fluxo de gás inerte que não interage com as moléculas do analito, sendo sua única função transportar o analito através da coluna até o detector. A separação dos constituintes da amostra é consequência de interações diferenciais com a fase estacionária, assim, idealmente, os constituintes se movem pela coluna com diferentes velocidades e eluem em tempos diferentes. Esta interação está relacionada com a pressão de vapor e à afinidade da molécula com a fase estacionária. Compostos com baixa volatilidade e forte interação com a fase estacionária são retidos na coluna cromatográfica e se movem mais lentamente ao longo da mesma, enquanto que compostos com menor ponto de ebulição e menor afinidade se movem mais rapidamente. Assim, moléculas diferentes interagem em diferentes intensidades com a fase estacionária, separam-se ao longo da corrida cromatográfica e chegam ao detector em tempos diferentes (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SKOOG *et al.*, 2006).

A GC-MS é uma técnica seletiva com alta sensibilidade e eficiência de separação, tornando-se uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação para a determinação de compostos voláteis e semi-voláteis.

A configuração básica de um espectrômetro de massas consiste em uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. Na fonte de ionização ocorre a produção de íons a partir dos analitos, estes íons são então separados por suas diferenças de razão massa/carga (m/z), conforme sua trajetória a partir de analisadores de massas, e, por fim, as razões m/z são registrados por um sistema para registro dos dados obtidos.

Diferentes fontes de ionização estão disponíveis para a espectrometria de massas moleculares, sendo, as mais comuns a Ionização por Elétrons (EI, do inglês *Electron Ionization*) e a Ionização Química (CI, do inglês *Chemical Ionization*). Os analisadores de massas disponíveis, baseiam-se na separação dos íons por meio de campo elétrico e/ou magnético, dos quais podem ser citados, os analisadores Quadrupolares (Q, do inglês *Quadrupole*), os analisadores por Tempo de Voo (TOF, do inglês *Time of Flight*) e, mais recentemente, a armadilha eletrostática de íons.

Na EI as moléculas são bombardeadas com um feixe de elétrons de alta energia (geralmente 70 eV), resultando na ionização das mesmas, podendo produzir íons positivos, íons negativos e espécies neutras. Os íons formados são menos estáveis e rapidamente se dividem em fragmentos menores à medida que as ligações químicas são quebradas, em um processo chamado de fragmentação. No analisador os íons são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z) em um campo eletrostático. A seguir, os íons separados atingem um detector de íons no qual produzem um sinal elétrico que é registrado e representado na forma de gráfico pelo sistema de dados, gerando um espectro de massas (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; SKOOG *et al.*, 2006).

A CI surgiu para aumentar a produção do íon molecular e reduzir as fragmentações associadas à EI. A CI consiste em produzir íons pela interação das moléculas dos analitos com os íons do gás reagente (metano, etano, amônia e isobutano), previamente formados na fonte. A formação dos íons radicais dos gases é proveniente da ionização por elétrons produzidos na fonte e estão presentes em maior quantidade do que o analito, garantindo a sua ionização. Os íons produzidos podem ser positivos ou negativos, e ainda é possível a formação de íons adutos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; JAVELLE; RIGHEZZA; DANGER, 2021).

Quanto aos analisadores de massas, os quadrupolos são formados por quatro barras metálicas (eletrodo), que geram campos elétricos oscilantes, capazes de estabilizar ou desestabilizar seletivamente os íons, de acordo com a m/z , durante sua passagem pelo centro do quadrupolo. O quadrupolo funciona como um filtro, isso permite que os íons de diferentes valores de m/z cheguem com tempos diferentes ao detector, e desta forma podem ser diferenciados. Este mesmo princípio pode ser utilizado para estabilizar a trajetória de apenas um íon desejado, que pode ser posteriormente fragmentado (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008; ZUBAREV; MAKAROV, 2013).

O Orbitrap (nome já consagrado para uma armadilha de íons de Kingdon quando utilizada em um espectrômetro de massas) é um analisador que possui alta resolução, oferecendo resultados com 4 casas decimais. Baseia-se no aprisionamento de íons utilizando campo eletrostático. Ele consiste em um eletrodo externo e um eletrodo interno fusiforme. A frequência e a amplitude das oscilações harmônicas dos íons presos em órbita ao longo do eixo do campo eletrostático são característicos de cada m/z , assim, a detecção dos íons é baseada na medição da imagem de corrente induzida pelo movimento coerente de íons, e o uso de transformada de Fourier (FT) do sinal no domínio do tempo para gerar a frequência e, depois, espectros de massa (ELIUK; MAKAROV, 2015; ZUBAREV; MAKAROV, 2013).

O alto desempenho da GC-MS permite a análise de muitos componentes de uma única amostra, com sensibilidade na faixa de picograma e quantificação de moléculas na faixa de picograma a miligrama (BOUTOU; CHATONNET, 2007), sendo utilizada para a determinação de diversos compostos em distintas matrizes, como, por exemplo, a determinação de compostos voláteis em cerveja (ALVES *et al.*, 2020; BENUCCI *et al.*, 2021; COELHO *et al.*, 2019; ZANELLA *et al.*, 2021; ZAPATA *et al.*, 2019).

2.4 Preparo de amostra

A viabilidade do uso da GC-MS como técnica de análise qualitativa e quantitativa de compostos em amostras complexas é dependente do preparo de amostra adequado. O preparo de amostra tem como objetivo compatibilizar a amostra ao equipamento utilizado, eliminar os interferentes presentes na amostra, possibilitar a pré-concentração de analitos das amostras quando necessário, além de realizar a conversão dos analitos para a forma apropriada para separação e/ou detecção (ANSARI; KARIMI, 2017; VALENTE; AUGUSTO, 2000).

As tendências atuais apontam no sentido da utilização de menores quantidades de amostras, até mesmo para análises de traços; obtenção de maior seletividade e especificidade na extração; aumento no potencial para automação ou utilização de métodos “*on line*”, reduzindo a operação manual; desenvolvimento de métodos sustentáveis. Dentro deste contexto, técnicas de microextração que utilizam quantidades mínimas de solventes orgânicos e menos etapas na preparação das amostras vêm sendo desenvolvidas (SOUZA-SILVA *et al.*, 2015).

2.4.1 Microextração em fase sólida

A SPME foi desenvolvida na década de 90 por Arthur e Pawliszyn como um método livre de solventes, econômico, simples e rápido, quando comparada a SPE. É uma técnica não exaustiva baseada no equilíbrio de partição dos analitos entre a matriz da amostra e a fase de extração, seguida da dessorção dos analitos (SOUZA-SILVA *et al.*, 2015). É uma técnica de extração na qual uma fibra de sílica recoberta com material sorbente é imersa na amostra, de modo direto ou por *headspace*. No modo direto os analitos semi-voláteis ou não-voláteis difundem-se diretamente da matriz da amostra para o revestimento da fibra no qual são concentrados. Já no modo de extração por *headspace* ocorre a sorção dos analitos voláteis entre a fase vapor e a matriz da amostra (SOUZA-SILVA *et al.*, 2015; VALENTE; AUGUSTO, 2000).

Alguns parâmetros como a seleção, o revestimento e a espessura da fibra devem ser otimizados de modo a obter melhor eficiência de extração. Além disso, é necessário considerar as condições de adsorção e dessorção, como tempo, temperatura e efeito do pH da amostra para adsorção. A seleção do revestimento da fibra é determinada pela polaridade do revestimento e sua seletividade em relação aos analitos em contraste com outros componentes da matriz. Uma vez que a SPME é baseada na distribuição de equilíbrio dos analitos entre a amostra, o *headspace* e a fase de extração, as propriedades do sorvente desempenham um papel fundamental na eficiência do processo (PLOTKA-WASYLKA *et al.*, 2017; SOUZA-SILVA; GIONFRIDO; PAWLISZYN, 2015).

O uso de SPME como técnica de extração possibilita a miniaturização de um sistema (utilizando pequenas ou nenhuma quantidade de solvente), o isolamento e a concentração dos analitos em uma única etapa, a automação de dispositivos e o acoplamento com instrumentos cromatográficos, podendo ser empregada para uma ampla gama de aplicações (analito e matriz), devido aos vários tipos de revestimentos das fibras (BOYACI *et al.*, 2015; SOUZA-SILVA; GIONFRIDO; PAWLISZYN, 2015). Em contrapartida, a principal limitação da SPME é a pequena quantidade de analito extraído devido a miniaturização do processo (SOUZA-SILVA; GIONFRIDO; PAWLISZYN, 2015).

Comercialmente, são disponíveis fibras com diversos tipos de revestimento, como por exemplo as fibras revestidas com poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), carboxen/divinilbenzeno (CAR/DVB) e divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). Sendo que nas fases DVB/PDMS e CAR/PDMS as extrações são dominadas pelo processo de

adsorção, enquanto nas fases PA e PDMS o processo de absorção prevalece. Quanto a polaridade, a fase PA se destaca com maior polaridade, enquanto a fase PDMS se caracteriza por ser mais apolar (HO; CANESTRARO; ANDERSON, 2011; JELEN; MAJCHER; DZIADAS, 2012; RODRIGUES; CALDEIRA; CÂMARA, 2008; SOUZA-SILVA; GIONFRIDO; PAWLISZYN, 2015).

A utilização da SPME como preparo de amostra e a GC-MS como técnica de análise têm sido aplicada com sucesso à análise de voláteis em diversos tipos de amostras, assim como na determinação de voláteis referente ao sabor/aroma de cervejas. Vieira *et al.* (2020) determinaram as condições ideais para a quantificação de 28 compostos sendo eles álcoois e ésteres superiores, aldeídos, ácidos graxos voláteis e VDK. Além disso, validaram a metodologia otimizada para a quantificação das VDK e analisaram diferentes amostras de cervejas. Na validação o LOQ foi definido em 9,06 μgL^{-1} e 22,95 μgL^{-1} para diacetil e 2,3-pentanodiona, respectivamente, com exatidão variando de 84,76% a 101,00% e 97,27% a 114,4 % para diacetil e 2,3-pentanodiona, respectivamente e em todas as amostras avaliadas as VDK estavam abaixo do LOQ.

Filipowska *et al.* (2020) avaliaram os parâmetros de extração para a quantificação de aldeídos presentes em maltes. O método foi validado e obteve linearidade com $R > 0,9988$, LOD de 0,28 - 0,99 μgL^{-1} , LOQ de 0,92 - 3,31 μgL^{-1} e recuperação de 95% a 105%.

Humia *et al.* (2020) investigaram a melhor condição do processo para produção de uma cerveja de batata doce com propriedades nutricionais e antioxidantes aprimoradas e boas características sensoriais. A HS-SPME-GC-MS foi empregada para a determinação de compostos bioativos e definição do perfil da cerveja. Foram encontrados ácidos carboxílicos, ésteres, álcoois, monoterpenos, sesquiterpenos e aldeídos.

Giannet *et al.* (2019) desenvolveram um método HS-SPME-GC-MS que foi aplicado a 79 cervejas *Lager* do estilo Pilsen (produtos artesanais e industriais) para avaliar seu perfil de sabor, no qual identificaram 111 compostos voláteis nas amostras, sendo ésteres, terpenos e álcoois as principais frações do sabor da cerveja. Utilizando a Análise Parcial por Quadrados-Discriminantes (PLS-DA) foi possível classificar as cervejas de acordo com seus diferentes métodos de produção e criar uma metodologia para a classificação das cervejas a partir dos perfis voláteis.

2.5 Otimização

No desenvolvimento de uma metodologia analítica, sempre há a busca por um processo que seja viável financeiramente, com o melhor rendimento/recuperação, com as condições que proporcionam melhor sensibilidade, precisão e exatidão. Além disso, é interessante que seja desenvolvido em um menor tempo e, para que isso ocorra, é necessário realizar a otimização do processo. A otimização é realizada de maneira a determinar as configurações e condições ideais de um processo (BEZERRA *et al.*, 2019; DEJAECHER *et al.*, 2011).

A otimização de uma metodologia analítica é baseada na investigação de suas variáveis (também chamadas de fatores), dos níveis que podem assumir e das respostas geradas pelas mudanças nas condições experimentais da metodologia. Os fatores podem ser definidos e redefinidos em determinados níveis, por exemplo, temperatura, pH, concentração de reagentes, tempo de reação, etc., e que afetam as respostas ou resultados de um método ou procedimento (BEZARRA *et al.*, 2019).

Essa otimização pode ser realizada com alterações das variáveis que afetam os resultados da metodologia de maneira univariada ou multivariada. Na otimização univariada é avaliada uma variável por vez, de forma independente, na qual todas as outras condições mantidas sem alteração, avaliando o efeito subsequente. Uma das desvantagens desta otimização é a não avaliação dos efeitos das interações entre as variáveis, além disso, quanto mais variáveis forem avaliadas, maior o número de experimentos que será necessário, acarretando maior consumo de reagente, tempo e despesas (BEZERRA *et al.*, 2008).

Já na otimização multivariada a avaliação ocorre com a variação de vários fatores simultaneamente. Isso diminui os reveses da otimização univariada, pois considera a interação entre as variáveis, diminui o número de experimentos e ainda prevê a quantidade de experimentos a ser realizado, diminuindo o tempo e o custo. Um dos modos de realizar a otimização multivariada é a utilização de um planejamento experimental, que é baseado na identificação dos fatores com maior influência e posteriormente determinação dos níveis ideais destes fatores, ou seja, o ótimo global (DEJAEGER; VANDER HEYDEN, 2011).

A determinação dos fatores com maior influência na metodologia deve ser realizada, pois os diferentes fatores podem afetar a resposta do sistema, tornando difícil identificar e controlar as pequenas contribuições de cada um. Para esta determinação podem ser utilizados experimentos fatoriais completos ou fracionários, como o

Delineamento fatorial completo de 2 níveis, o Delineamento de Box-Behnken e Delineamento de composto central (DCC, do inglês *Central Composite Design*) (HIBBERT, 2012).

Após a realização e obtenção de respostas do planejamento experimental, pode-se estabelecer uma função na qual a variável dependente é a resposta e as variáveis independentes são os fatores que a influenciam. Essa função é chamada de superfície de resposta e permite prever como uma variação nos valores das variáveis afeta a resposta e, portanto, escolher os valores que fornecem a melhor resposta, ou seja, a região ótima. A forma da superfície de resposta pode ser representada graficamente no espaço tridimensional ou bidimensional, como os gráficos de contorno (CALLAO, 2014).

Em algumas situações a otimização pode envolver mais de uma resposta ao mesmo tempo, sendo chamada de otimização de multirespostas. Nesta situação, são observados um ou mais perfis para cada tratamento experimental e, para a determinação da região ótima deve-se garantir o cumprimento dos critérios de todas as respostas envolvidas, identificando o perfil mais próximo a um perfil que representa a resposta conjunta desejável. Para isto, as diversas respostas podem ser combinadas em uma única através do uso de uma função matemática, como a média geométrica, obtendo-se assim uma superfície resposta que permite verificar os valores ótimos de cada variável, satisfazendo simultaneamente, e na medida do possível, todas as respostas consideradas (FERREIRA *et al.*, 2019; FOGLIATTO, 2008; VERA *et al.*, 2014).

O planejamento experimental e a metodologia de superfície de resposta tornaram-se úteis para desenvolver, melhorar e otimizar processos de determinação simultânea de diferentes compostos responsáveis pela formação do sabor e aroma de uma cerveja (DACK *et al.*, 2017; LEÇA *et al.*, 2015 MOREIRA *et al.*, 2013; NESPOR *et al.*, 2018; STEFANAUTO *et al.*, 2017; VIEIRA *et al.*, 2020).

2.6 Validação

No desenvolvimento de um método analítico, a validação é uma etapa essencial, uma vez que garante que a sua utilização para determinado fim seja atendida, assegurando resultados confiáveis e que as análises futuras terão resultados próximos o suficiente do valor verdadeiro. Para isso, todos os detalhes da análise devem ser relatados, pois a validação é confiável para um método analítico otimizado em condições específicas, considerando a determinação de um analito em uma matriz

específica. Caso haja alteração de algumas dessas condições, a validação realizada não pode ser utilizada (BARWICK, 2019; EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020).

Além de novas metodologias a validação também deve ser realizada quando são realizadas adaptações a métodos já validados, desde a modificação direta na metodologia até o uso de diferentes equipamentos. Diversos órgãos definem protocolos ou guias para a validação de métodos analíticos como requisitos para assegurar a qualidade em laboratórios de ensaio. É importante esclarecer que *resoluções* são documentos com poder de lei, que devem ser obedecidas e *guias* são documentos que sugerem uma linha a ser seguida e são, portanto, abertos para interpretação. Os guias são recomendações e são intencionalmente vagos para deixar aos analistas a flexibilidade de adaptá-los de acordo com o método a ser usado. No Brasil, há três agências que regulamentam a validação de métodos analíticos, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimentos) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia).

No presente trabalho, alguns parâmetros de desempenho são adotados para garantir a confiabilidade do método, como a linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) e limite de quantificação (LOQ do inglês *limit of quantification*), de acordo com os guias de validação da ANVISA e da EURACHEM (BRASIL, 2011; EURACHEM, 2014).

A linearidade de um procedimento analítico é a sua habilidade em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, considerando uma dada faixa de concentração (BARWICK, 2019; EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020).

Quanto aos limites de detecção e quantificação, o LOD é a concentração mais baixa em que o analito pode ser detectada pelo método em um nível de confiança específico, salientando que uma leitura abaixo do LOD não indica a ausência do analito. A definição do LOQ é a concentração mais baixa do analito que pode ser quantificada com desempenho aceitável do método. Os valores de LOD e LOQ podem ser estimados por métodos específicos para técnicas visuais, de sinal/ruído, ou pelos dados da curva analítica (BARWICK, 2019; EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020).

A precisão de um método analítico é a maneira quantitativa de prever a dispersão dos resultados obtidos por meio de medições repetidas adequadamente em condições determinadas, ou seja, prever em forma de valores o quão próximo os

resultados estão uns dos outros. Podendo ser expressa por meio da repetibilidade e da precisão intermediária, sendo usualmente determinadas por meio do coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) (BARWICK, 2019; EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020).

A repetibilidade é a estimativa da dispersão dos resultados obtidos nas mesmas condições sem nenhuma alteração, como o mesmo operador, o mesmo equipamento, as mesmas condições de operação, o mesmo preparo, o mesmo laboratório e realizadas em um curto intervalo de tempo. Já a precisão intermediária estima a dispersão dos resultados a partir da variação de pelo menos uma das condições de análise, como por exemplo, equipamento, analistas ou a realização do mesmo procedimento em épocas distintas (BARWICK, 2019; EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020).

A recuperação de uma metodologia está relacionada com a capacidade da extração da metodologia utilizada, sendo possível determinar a quantidade do analito presente ou adicionada na amostra que é realmente extraída e passível de ser quantificada (BARWICK, 2019; EURACHEM, 2014; INMETRO, 2020).

2.7 Análise dos componentes principais (PCA)

A análise dos componentes principais (PCA), é uma técnica quimiométrica não supervisionado, no qual não são fornecidas informações prévias sobre as classes de cada amostra e a visualização dos dados após processamento pode ser feita em um espaço reduzido, o que possibilita identificar similaridades entre as amostras (WANG *et al.*, 2021; CUCU *et al.*, 2021).

A PCA se fundamenta na decomposição/projeção multivariada, transformando o conjunto original de variáveis em componentes principais a partir de combinações lineares das variáveis originais e de dimensões equivalentes, permitindo a construção de gráficos bidimensionais, onde os *loadings* representam a relação entre as variáveis e os *scores* representam a relação entre as amostras. A partir do gráfico gerado, os dados podem ser avaliados todos ao mesmo tempo, sendo possível verificar quais variáveis estão influenciando no sistema e delimitar agrupamentos entre as amostras de acordo com as suas similaridades (ROSSI *et al.*, 2014).

Assim, o uso de PCA possibilita a extração de informações de dados obtidos por metodologia analítica, como por exemplo, a obtenção de combinações interpretáveis das variáveis, a visualização de agrupamentos formados, a descrição e o entendimento da

estrutura de correlação das variáveis e a redução da dimensionalidade dos dados (MARTINS *et al.*, 2020).

Assim, utilizando uma metodologia que envolva SPME-GC-MS e empregando PCA para processamento dos dados, torna-se possível realizar análises de cervejas industriais, comparando-as com cervejas caseiras, em relação a presença de contaminantes, como os desreguladores endócrinos.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas do mundo e nos últimos anos o cenário cervejeiro sofreu uma mudança com a inserção cada vez maior das cervejas especiais ou artesanais, que são produzidas visando a maior qualidade. A produção da cerveja envolve etapas como moagem, brasagem, fervura, fermentação, maturação, filtração e envase. A fermentação é considerada uma das etapas cruciais quanto a qualidade da cerveja, nesta etapa ocorre o consumo dos açúcares fermentescíveis produzindo etanol e subprodutos como ésteres, ácidos e álcoois superiores que podem contribuir negativamente para o sabor e aroma da cerveja dependendo da concentração em que está presente na cerveja.

A caracterização da cerveja quanto à presença destes compostos, denominados *off-flavours*, torna-se interessante uma vez que os consumidores estão cada vez mais em busca de produtos de qualidade e a quantificação de cada um desses compostos mostra-se necessário uma vez que a concentração determina o sabor que este composto acarretará para a cerveja.

Além da caracterização da cerveja quanto ao sabor, pode-se avaliar a cerveja quanto a presença de contaminantes como ftalatos, que são desreguladores endócrinos com potencial carcinogênico, mostrando-se prejudicial à saúde humana mesmo em pequenas concentrações. A presença dos ftalatos na cerveja pode ser proveniente do contato da mesma com materiais plásticos, seja durante a produção em fermentadores, mangueiras e conectores ou durante o armazenamento em envases que contenham plástico como por exemplo os *growlers*.

Além disso, o MAPA estabelece padrões de identidade e qualidade para produtos de cervejaria, pela Instrução Normativa n° 65, de dezembro de 2019, avaliando os parâmetros organoléptico, por meio de aromas e sabores característicos que devem condizer com a matéria prima e processos utilizados, sem aromas e sabores estranhos, em complemento os contaminantes (arsênio, chumbo, cádmio e estanho) devem

obedecer seus respectivos limites máximos. As análises de rotina devem ser realizadas utilizando os métodos analíticos da Convenção de Cervejeiros da Europa (EBC, do inglês European Brewers Convention). Ressalta-se que não há nenhuma norma oficial para análise dos *off-flavours* (ácido acético, ácido butanóico, ácido isovalérico, ácido octanóico, 2-butanol, isobutanol, 1-butanol, álcool isoamílico e acetato de etila) e dos contaminantes (DMP, DEP, DBP, DiBP e DEHP).

A caracterização da cerveja quanto a presença de *off-flavours* e ftalatos, pode ser realizada por meio de metodologias analíticas que envolvem o uso de HS-SPME e GC-MS, proporcionando a separação dos analitos da matriz, uma vez que a cerveja é uma matriz complexa por apresentar centenas de compostos, e garantindo a separação, identificação e quantificação dos analitos.

Diante disso, ao longo desse trabalho, buscou-se empregar as técnicas de HS-SPME e GC-MS para a determinação de compostos de interesse em cervejas convencionais e especiais, produzidas industrialmente e caseira.

Nesse sentido, foi desenvolvida e validada uma metodologia para determinação de compostos que afetam diretamente o aroma e sabor dessas bebidas. A metodologia foi otimizada por um planejamento experimental de forma multivariada em um delineamento de composto central, definindo a temperatura de 50 °C, tempo de extração de 30 min e pH 5 como as condições ótimas de extração. Esta metodologia foi validada avaliando a linearidade, limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), repetibilidade (intra-dia), reprodutibilidade (inter-dia) e recuperação. O método otimizado e validado foi utilizado para a determinação de nove substâncias voláteis em dezessete cervejas. Este trabalho foi desenvolvido na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Também foi desenvolvida uma metodologia para a determinação de ftalatos em cervejas industriais e caseiras, a otimização foi realizada por delineamento do composto central, definindo as condições ideais de extração em 70 °C e 30 minutos. Esta metodologia foi validada avaliando a linearidade, limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), precisão e exatidão. O método otimizado e validado foi utilizado para a determinação de cinco ftalatos em trinta e três cervejas. Este trabalho foi realizado em parceria com o Prof. Dr. Leandro Wang Hantao da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), onde o método foi validado e as amostras foram analisadas utilizando o GC-FT *Orbitrap* MS.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, N. E. C.; AGUIAR, I.; CARDOSO, D. R. Mechanism of Hop-Derived Terpenes Oxidation in Beer. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 11, p. 2362-2368, 2015.

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

ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico - Critérios Gerais e Classificação de Materiais para Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos constante do Anexo desta Resolução. **D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo**, v. 91, Maio 2001.

ANVISA. Dispõe sobre Regulamento Técnico sobre Lista Positiva de Aditivos para Materiais Plásticos destinados à Elaboração de Embalagens e Equipamentos em Contato com Alimentos. **D.O.U. - Diário Oficial da União**, v. 17, Março 2008.

ANVISA. Dispõe sobre a lista positiva de monômeros, outras substâncias iniciadoras e polímeros autorizados para a elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. **Diário Oficial da União**, v. 56, Novembro 2012.

ANSARI, S.; KARIMI, M. Novel developments and trends of analytical methods for drug analysis in biological and environmental samples by molecularly imprinted polymers. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 89, p. 146-162, 2017.

BARTH, R. The chemistry of beer: the science in the suds. **John Wiley & Sons**, p. 172-173, 2013.

BENUCCI, I. *et al.* Novel microencapsulated yeast for the primary fermentation of green beer: kinetic behavior, volatiles and sensory profile. **Food Chemistry**, v. 340, p. 127900, 2021.

BEZERRA, M. A. *et al.* Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. **Talanta**, v. 194, p. 941-959, 2019.

BEZERRA, M. A. *et al.* Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The microbiology of malting and brewing. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 77, n. 2, p. 157-72, 2013.

BOUTOU, S.; CHATONNET, P. Rapid headspace solid-phase microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric assay for the quantitative determination of some of the main odorants causing off-flavours in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, n. 1, p. 1-9, 2007.

BOYACI, E. *et al.* Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. **Analytica Chimica Acta**, v. 873, p. 14-30, May 2015.

BRAGA, G. C. *et al.* Volatile profile of yellow passion fruit juice by static headspace and solid phase microextraction techniques. **Ciencia Rural**, v. 45, n. 2, p. 356-363, 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Decreto nº 65, de 11 de novembro de 2019**. Dispõe sobre a padronização, classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RE n.º 899, de 29 de maio de 2003**. Guia para métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. Série 1, p. 15.

BRASIL, Agência nacional de vigilância sanitária ANVISA. **Resolução RDC n.º 7, de 18 de fevereiro de 2011**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, 2011, p.72.

BUDNER, D.; CARR, J.; SERAFINI, B.; TUCKER, S. *et al.* Statistical Significant Differences between Aroma Profiles of Beer Brewed from Sorghum. **Beverages**, 7, n. 3, p. 56, 2021.

CALLAO, M. P. Multivariate experimental design in environmental analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 62, p. 86-92, 2014.

CALLEJÓN, R. M. *et al.* Recent developments in the analysis of musty odour compounds in water and wine: A review. **Journal of Chromatography A**, v. 1428, p. 72-85, 2016.

CAPECE, A. *et al.* Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. **International Journal of Food Microbiology**, v. 284, p. 22-30, 2018.

CARNOL, L.; SCHUMMER, C.; MORIS, G. Quantification of Six Phthalates and One Adipate in Luxembourgish Beer Using HS-SPME-GC/MS. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 2, p. 298–309, 2017.

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.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food. **Quimica Nova**, v. 31, n. 3, p. 623–636, 2008.

COELHO, E. *et al.* Volatile fingerprinting differentiates diverse-aged craft beers. **LWT**, v. 108, p. 129-136, 2019.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, 2006.

CUCU, T.; DAVID, F.; DEVOS, C.; SANDRA, P. Untargeted flavor profiling of lager beers by stir bar sorptive extraction –capillary gas chromatography – time-of-flight mass spectrometry: High analytical performance with a green touch. **Journal of Chromatography A**, v. 1647, p. 462164, 2021.

DA SILVA, G. C. *et al.* Method development by GC-ECD and HS-SPME-GC-MS for beer volatile analysis. **Food Chemistry**, v. 167, p. 71-77, 2015.

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.

DEJAEGHER, B.; VANDER HEYDEN, Y. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, n. 2, p. 141-158, 2011.

ELIUK, S.; MAKAROV, A. Evolution of Orbitrap Mass Spectrometry Instrumentation. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 8, n. 1, p. 61–80, 2015.

EURACHEM. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods**, ed. 2. 2014. <www.eurachem.org>. acessado em 10 set. 2020.

FAN, C.-C.; LIN, T.-F. N-nitrosamines in drinking water and beer: Detection and risk assessment. **Chemosphere**, v. 200, p. 48-56, 2018.

FERREIRA, S. L. C. *et al.* Multivariate optimization techniques in food analysis – A review. **Food Chemistry**, v. 273, p. 3-8, 2019.

FILIPOWSKA, W. *et al.* Determination of optimal sample preparation for aldehyde extraction from pale malts and their quantification via headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1612, p. 460647, 2020.

FONSECA, R. B. F. *et al.* Microfibers for juice analysis by solid-phase microextraction. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. SUPPL, p. 166-169, 2008.

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, p. 103991, 2019.

GIULIANI, A. *et al.* Critical Review on the Presence of Phthalates in Food and Evidence of Their Biological Impact. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 16, p. 5655, 2020.

GONÇALVES, J. L. *et al.* A powerful methodological approach combining headspace solid phase microextraction, mass spectrometry and multivariate analysis for profiling the volatile metabolomic pattern of beer starting raw materials. **Food Chemistry**, v. 160, p. 266-280, 2014.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. **Journal of Chromatography B**, v. 910, p. 2-13, 2012.

HO, T. D.; CANESTRARO, A. J.; ANDERSON, J. L. Ionic liquids in solid-phase microextraction: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 695, n. 1, p. 18-43, 2011.

HORLACHER, N.; SCHWACK, W. Determination of 2-Aminoacetophenone in wine by high-performance thin-layer chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1432, p. 140-144, 2016.

HORNINK, G. G.; GALEMBECK, G. **Glossário cervejeiro: da cultura à ciência**. Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL: 2019.

HUMIA, B. V. *et al.* Physicochemical and sensory profile of Beaugard sweet potato beer. **Food Chemistry**, v. 312, p. 126087, 2020.

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos**, Doq-Cgcre-008-Rev.09, 2020.

JAVELLE, T., RIGHEZZA, M., DANGER, G. Identify low mass volatile organic compounds from cometary ice analogs using gas chromatography coupled to an Orbitrap mass spectrometer associated to electron and chemical ionizations. **Journal of Chromatography A**, v. 1652, p. 462343, 2021.

JELEŃ, H. H.; MAJCHER, M.; DZIADAS, M. Microextraction techniques in the analysis of food flavor compounds: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 738, p. 13-26, 2012.

LEÇA, J. M. *et al.* Optimal design of experiments applied to headspace solid phase microextraction for the quantification of vicinal diketones in beer through gas chromatography-mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 887, p. 101-110, 2015.

LIVENS, S. Beer: Fermentation. In: CABALLERO, B.; FINGLAS, P. M., *et al* (Ed.). **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p.339-344.

LORENCOVÁ, E. *et al.* Evaluation of force-carbonated Czech-type lager beer quality during storage in relation to the applied type of packaging. **Food Control**, v. 106, p. 106706, 2019.

MA, C. *et al.* Analysis of flavour compounds in beer with extruded sorghum as an adjunct using headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 2, p. 251-260, 2016.

MARTINS, Z. E.; MACHADO JR., J. C.; CUNHA, S. C.; BARATA, A. M. *et al.* A chemometric approach to compare Portuguese native hops with worldwide commercial varieties. **Journal of Chemometrics**, v. 34, n. 9, p. 3285, 2020.

- MOREIRA, N. *et al.* Optimization of the HS-SPME–GC–IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers. **Talanta**, v. 117, p. 523-531, 2013.
- NEŠPOR, J. *et al.* Application of response surface design to optimise the chromatographic analysis of volatile compounds in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 3, p. 244-253, 2018.
- NIU, Y. *et al.* Characterization of the key aroma compounds in different light aroma type Chinese liquors by GC-olfactometry, GC-FPD, quantitative measurements, and aroma recombination. **Food Chemistry**, v. 233, p. 204-215, 2017.
- OLANIRAN, A. O. *et al.* Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 13-23, 2017.
- PASCARI, X. *et al.* Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. **Food Research International**, v. 103, p. 121-129, 2018.
- PERESTRELO, R.; SILVA, C. L.; ALGARRA, M.; CÂMARA, J. S. Monitoring Phthalates in Table and Fortified Wines by Headspace Solid-Phase Microextraction Combined with Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 31, p. 8431–8437, 2020.
- PIRES, E. J. *et al.* Yeast: the soul of beer’s aroma-a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1937-1949, 2014.
- PŁOTKA-WASYLKA, J. *et al.* Extraction with environmentally friendly solvents. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 91, p. 12-25, 2017.
- PORTEA, A.; PORTEB, L. H. M.; OLIVEIRA, L. M. Cromatografia gasosa quiral na resolução de enantiômeros envolvidos em flavours de frutas. **Química Nova**, v. 37, p. 1670-1679, 2014.
- ROSSI, S.; SILEONI, V.; PERRETTI, G.; MARCONI, O. Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 5, p. 919-928, 2014.
- RODRIGUES, F.; CALDEIRA, M.; CÂMARA, J. S. Development of a dynamic headspace solid-phase microextraction procedure coupled to GC–qMSD for evaluation the chemical profile in alcoholic beverages. **Analytica Chimica Acta**, v. 609, n. 1, p. 82-104, 2008.
- RUVALCABA, J. E. *et al.* Development of a stir bar sorptive extraction method to study different beer styles volatile profiles. **Food Research International**, v. 126, p. 108680, 2019.

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, n. 1-2, p. 342-349, 2008.

SANTOS, M. S.; CARASEK, E. Development of a simple analytical method for determining trihalomethanes in beer using a headspace solid-phase microextraction technique. **Quimica Nova**, v. 36, p. 1052-1056, 2013.

SASAKI, T. *et al.* Characterisation of odorants in roasted stem tea using gas chromatography–mass spectrometry and gas chromatography-olfactometry analysis. **Food Chemistry**, v. 220, p. 177-183, 2017.

SCHABO, D. C. *et al.* Mycotoxins in artisanal beers: An overview of relevant aspects of the raw material, manufacturing steps and regulatory issues involved. **Food Research International**, v. 141, p. 110114, 2021.

SCHMARR, H.-G.; KEISER, J.; KRAUTWALD, S. An improved method for the analysis of 2-aminoacetophenone in wine based on headspace solid-phase microextraction and heart-cut multidimensional gas chromatography with selective detection by tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1477, p. 64-69, 2016.

SKOOG *et al.* **FUNDAMENTOS DE QUÍMICA ANALÍTICA**. Tradução da 8ª Edição norte-americana. Editora Thomson, 2006.

SOUZA-SILVA, T. A.; GIONFRIDDO, E.; PAWLISZYN, J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 236-248, 2015.

SOUZA-SILVA, T. A. *et al.* A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 224-235, 2015.

STEFANUTO, P. H. *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, 2017.

TIAN, J. Determination of several flavours in beer with headspace sampling-gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1318-1321, 2010.

TROVATO, E.; ARIGÒ, A.; VENTO, F.; MICALIZZI, G. *et al.* Influence of Citrus Flavor Addition in Brewing Process: Characterization of the Volatile and Non-Volatile Profile to Prevent Frauds and Adulterations. **Separations**, 8, n. 2, p. 18, 2021.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Quimica Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VERA, C. L. *et al.* Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. **Talanta**, v. 124, p. 123-138, 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, p. 126466, 2020.

WANG, Y.; HE, T.; WANG, J.; WANG, L. *et al.* High performance liquid chromatography fingerprint and headspace gas chromatography-mass spectrometry combined with chemometrics for the species authentication of Curcumae Rhizoma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 202, p. 114144, 2021.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast The Practical Guide to Beer Fermentation**. Boulder: Brewers Publications, 2010.

YE, C-W. *et al.* Development and application of an SPME/GC method for the determination of trace phthalates in beer using a calix[6]arene fiber. **Analytica Chimica Acta**, v. 641, n. 1–2, p. 64–74, 2009.

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.

ZAPATA, P. J. *et al.* Phenolic, volatile, and sensory profiles of beer enriched by macerating quince fruits. **LWT**, v. 103, p. 139-146, 2019.

ZUBAREV, R. A.; MAKAROV, A. Orbitrap Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 11, p. 5288–5296, 2013.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE *OFF-FLAVOURS* EM CERVEJA POR HS-SPME-GC-MS

ARTIGO 2 – OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE FTALATOS POR HS-SPME/GC-MS EM CERVEJAS CASEIRAS E INDUSTRIAIS

ARTIGO 1**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA
DETERMINAÇÃO DE *OFF-FLAVOURS* EM CERVEJA
POR HS-SPME-GC-MS**

Andressa A. Gonçalves^{1*}, Letícia F. Pereira¹, Márcio P. Pedroso^{1*}

1 Laboratório de Pesquisa em Química Analítica, Departamento de Química,
Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

* Autores correspondentes

Andressa A. Gonçalves: andressa.goncalves91@yahoo.com.br

Márcio P. Pedroso: marciopedroso@ufla.br

RESUMO

A qualidade da cerveja pode ser avaliada pela presença de subprodutos da fermentação como ésteres, ácidos e álcoois superiores, que em determinadas concentrações contribuem prejudicialmente à qualidade da cerveja, sendo chamados de *off-flavours*. Neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia para a quantificação simultânea destes compostos por HS-SPME e GC-MS em cervejas industriais e artesanais. A metodologia foi otimizada por um planejamento experimental de forma multivariada em um delineamento de composto central, definindo a temperatura de 50 °C, tempo de extração de 30 min e pH 5 como as condições ótimas de extração. Esta metodologia foi validada avaliando a linearidade, limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), repetibilidade, precisão intermediária e recuperação. O método otimizado e validado foi utilizado para a determinação de 9 substâncias voláteis em 17 cervejas.

Palavras-chave: Cerveja, *off-flavours*, HS-SPME, GC-MS

1 Introdução

A cerveja é uma bebida alcoólica obtida por processos de fermentação a partir do malte, cevada, água, lúpulo e leveduras. É uma mistura extremamente complexa com uma ampla gama de componentes químicos, como, açúcares, carboidratos, sacarídeos, aminoácidos, proteínas, vitaminas e compostos voláteis, que determinam o sabor, o aroma e a cor da cerveja (ANDERSON *et al.*, 2019; BOKULICH; BAMFORTH, 2013; DA SILVA *et al.*, 2015; GUIDO, 2015).

A qualidade da cerveja pode ser determinada pela preservação da estabilidade sensorial, que se tornou então o parâmetro de qualidade mais importante para as cervejarias. A presença singular dos compostos voláteis influencia no sabor/aroma da cerveja e também contribuem na construção do sabor de fundo da cerveja (MA *et al.*, 2016). Alguns compostos voláteis são denominados *off-flavours*, pois a sensação gerada a partir do cheiro e do gosto é desagradável ao consumidor (PORTEA *et al.*, 2014). Esses *off-flavours* podem ser originários de diversas fontes e de diferentes etapas do processo de produção da cerveja: podem surgir durante a etapa de fermentação, maturação ou armazenagem, por meio de insumos de baixa qualidade, contaminação por microorganismos, condições de armazenamento inadequado de ingredientes e do produto final (CALLEJÓN *et al.*, 2016; HUMIA *et al.*, 2019).

Em busca da produção de cervejas com qualidade e sabor agradável, é indispensável o controle de compostos como álcoois, ésteres, ácidos orgânicos,

aldeídos, compostos carbonílicos e substâncias terpênicas, que contribuem para o perfil organoléptico da cerveja. Dentre esses compostos, alguns podem promover sabor e aroma indesejáveis, como exemplos, pode-se mencionar acetaldeído, 2,3-butadiona, ácido acético e butanoato de etila (HUMIA *et al.*, 2019).

A presença desses compostos nas bebidas se deve a diversos fatores. Com relação aos ácidos orgânicos, a formação ocorre durante a fermentação, sendo inevitável a presença destes na cerveja. Apesar disso, quando estão presentes em altas concentrações, pode indicar má sanitização dos equipamentos e/ou baixo controle das condições de fermentação. Em concentração superior ao limiar de percepção torna-se desagradável e pode provocar sabor azedo com notas adstringentes e amargas, especificamente sabor de vômito de bebê no caso do ácido butírico ou sabor de sabão, no caso do ácido caprílico (HORNINK; GALEMBECK, 2019).

A presença de outros álcoois além do etanol na cerveja é desejável, visto que são necessários para a síntese de ésteres, os quais são compostos ativos no sabor e aroma da cerveja (DACK *et al.*, 2017). Entretanto, em condições inadequadas de fermentação, nas quais ocorre um estresse da levedura, esses compostos são produzidos em altas concentrações e tornam-se um revés no sabor e aroma da cerveja, provocando um sabor de solvente na cerveja e uma sensação de aquecimento (WHITE; ZAINASHEF, 2010).

Embora a determinação desses compostos importantes para a qualidade sensorial da cerveja não seja obrigatória pela legislação brasileira, determiná-los auxilia na avaliação da qualidade da cerveja produzida (GONZALEZ *et al.*, 2020), uma vez que para cada composto, há uma concentração mínima necessária para que seja possível perceber a presença dele como um *off-flavour*.

Assim, métodos para a determinação simultânea de compostos voláteis em cerveja vêm sendo desenvolvidos, os quais geralmente estão baseados em um preparo da amostra e posterior determinação por GC-MS. A microextração em fase sólida através do *headspace* (HS-SPME) é a técnica mais empregada para o preparo de amostra de cervejas, visto que proporciona a separação dos analitos da matriz complexa, eliminando interferentes inviáveis para análise de forma direta em GC-MS. Dessa forma, a HS-SPME foi empregada em diversas análises de cervejas industriais, como para a determinação do perfil volátil ao longo do processo de fermentação (ALVES *et al.*, 2020; SAISON *et al.*, 2008), a avaliação de voláteis representantes do envelhecimento (SAISON *et al.*, 2008), a avaliação do perfil *flavors* (GIANNETTI *et al.*, 2019), a comparação do perfil *flavors* entre cervejas produzidas com sorgo

extrusado e não extrusado (MA *et al.*, 2016), e a otimização multivariada de diversas classes de compostos voláteis (VIEIRA *et al.*, 2020). Embora os trabalhos de Vieira *et al.* (2020) e Ma *et al.* (2016) tenham determinado vários compostos simultaneamente, cabe destacar que no primeiro há apenas um ácido carboxílico dentre os compostos avaliados, enquanto que no trabalho de Ma *et al.* (2016) não há a validação de todos os compostos do método desenvolvido.

Além da SPME, a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) foi usada para extração de ácidos carboxílicos (HORÁK *et al.*, 2008) e avaliação do perfil volátil de cervejas artesanais (COELHO *et al.*, 2019), na qual os procedimentos envolveram a SBSE e re-extração em solvente orgânico, o que torna o procedimento moroso.

Assim, a HS-SPME aliada a GC-MS mostram-se técnicas adequadas para a determinação de compostos voláteis presentes na cerveja, proporcionando a separação, identificação e quantificação. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi otimizar e validar um método através de HS-SPME e GC-MS para a determinação quantitativa de quatro ácidos carboxílicos (Ácido Acético, Ácido Butanóico, Ácido Isovalérico (3-metilácidobutanóico), Ácido Octanóico), quatro álcoois (2-Butanol, Isobutanol (2-metilpropan-1-ol), 1-Butanol, Isoamílico (3-metil-butan-1-ol)) e acetato de etila em cervejas convencionais e artesanais.

2 Materiais e Métodos

2.1 Reagentes e amostras

Foram empregados os padrões de acetato de etila, 2-Butanol, Isobutanol (2-metilpropan-1-ol), 1-Butanol, Isoamílico (3-metil-butan-1-ol), Ácido Acético, Ácido Butanóico, Ácido Isovalérico (3-metilácidobutanóico), Ácido Octanóico e 3-Heptanol, todos com grau de pureza superior a 97%, e o solvente Álcool Etilico (99,9%) adequado para análises por GC-MS. A fibra utilizada foi a 50/30 μm divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (PDMS/CAR/DVB) adquirida da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

Uma solução de padrão interno (PI) de 3-Heptanol em etanol foi preparada a uma concentração de 200 mg L^{-1}

Soluções estoques de 5000 mg L^{-1} de cada um dos analitos foi preparada em álcool etílico. Em seguida uma solução intermediária foi preparada em solução alcoólica 5% v/v na concentração de 100 mg L^{-1} para Acetato de etila, 1-Butanol, Isoamílico (3-metil-butan-1-ol), Ácido Octanóico, e de 500 mg L^{-1} para 2-Butanol, Isobutanol (2-

metil-propan-1-ol), Ácido Butanóico, Ácido Isovalérico (3-metilácidobutanóico) e Ácido acético em função da resposta desses compostos no GC-MS.

A partir desta solução preparou-se os padrões em solução alcoólica 5 % v/v para a construção da curva analítica nas concentrações apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentrações dos analitos para construção da curva analítica (em mg L⁻¹).

Analito	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5
Acetato de Etila	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
2-Butanol	5,0	25,0	50,0	125,0	250,0
Isobutanol	5,0	25,0	50,0	125,0	250,0
1-Butanol	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
Isoamílico	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0
Ácido Acético	12,5	25,0	50,0	250,0	500,0
Ácido Butanóico	5,0	25,0	50,0	125,0	250,0
Ácido Isovalérico	5,0	25,0	50,0	125,0	250,0
Ácido Octanóico	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0

Dezessete amostras de cervejas brasileiras de diferentes estilos foram analisadas, das quais onze amostras foram produzidas industrialmente (quatro por grandes cervejarias e sete obtidas em microcervejarias da região de Minas Gerais) e seis amostras foram produzidas por cervejeiros caseiros. Todas as amostras foram armazenadas a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ e desgaseificadas em banho ultrassônico por 8 minutos, antes das extrações.

2.2 HS-SPME e GC-MS

As extrações foram realizadas manualmente, por HS-SPME empregando 5 mL de amostra, dopada com $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de PI, contendo 2,0 g de NaCl, sob aquecimento em banho maria e agitação. A fibra de PDMS/CAR/DVB foi exposta no HS nas melhores condições otimizadas.

As análises cromatográficas foram realizadas na Central de Análises e Prospecção Química (CAPQ/UFLA) em um GC-MS QP2010 Plus (Shimadzu, Japão). A coluna utilizada foi a RTX-WAX (Polietilenoglicol - PEG) de dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm . O gás de arraste utilizado foi Hélio (99,999%) com um fluxo de 1,0 mL

min⁻¹. O injetor foi operado no modo *split* com razão 1:10, à uma temperatura de 250 °C. A programação de aquecimento do forno do cromatógrafo iniciou em 40 °C e manteve-se por 5 min, com aumento para 190 °C a uma taxa de 10 °C min⁻¹, mantida por 5 min, aumento para 230 °C a uma taxa de 20 °C min⁻¹, mantida por 2 min, totalizando 29,0 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo monitoramento de íons selecionados (SIM), com ionização por elétrons (EI) e energia de 70 eV. A temperatura da fonte de íons foi de 200 °C e a temperatura de interface de 240 °C. A identificação dos analitos foi baseada na comparação com padrões conforme o tempo de retenção e o espectro de massa. Para a quantificação de cada composto, foram selecionados íons e intervalos de tempo de monitoramento conforme apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 – Íons monitorados dos analitos, seus respectivos tempos de retenção.

Analito	Íons	Tempo de Retenção (min)
Acetato de Etila	43*/61/70	2,48
2-Butanol	45*/59/57	4,75
Isobutanol	43*/41/42	6,60
1-Butanol	56*/41/43	7,72
Isoamílico	55*/42/70	9,02
Ácido Acético	43*/45/60	12,78
Ácido Butanóico	60*/73/41	15,10
Ácido Isovalérico	60*/41/43	15,61
Ácido Octanóico	60*/73/101	19,86

* íon de quantificação

2.3 Otimização HS-SPME

As condições para a extração simultânea dos 9 compostos em cerveja por HS-SPME foram obtidas através de estudo multivariado, no qual foram otimizados os seguintes parâmetros: tempo de extração, pH e temperatura. Um planejamento do tipo Composto Central (CCD) foi realizado, com três repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos, realizados em ordem aleatória, descritos na Tabela 3. Para todas as extrações foram empregados 5 mL de solução na concentração de 7,5 mg L⁻¹, 10 µL da solução de padrão interno 200 mg L⁻¹ e 2,0 g de NaCl.

A condição ótima para extração foi obtida através de um gráfico de superfície de resposta na qual média geométrica das razões das áreas entre cada analito e o PI foi adotada como resposta.

A matriz do delineamento experimental e a superfície de respostas foram realizadas utilizando o *software* Chemoface foi utilizado para gerar os experimentos do CCD e a superfície de respostas.

Tabela 3 – Condições de tempo, temperatura e pH para o CCD.

Teste	Tempo (min)	Temperatura (° C)	pH
1	12 (-1)	30 (-1)	3 (-1)
2	12 (-1)	30 (-1)	7 (+1)
3	12 (-1)	70 (+1)	3 (-1)
4	12 (-1)	70 (+1)	7 (+1)
5	40 (+1)	30 (-1)	3 (-1)
6	40 (+1)	30 (-1)	7 (+1)
7	40 (+1)	70 (+1)	3 (-1)
8	40 (+1)	70 (+1)	7 (+1)
9	2.45 (-1,4)	50 (0)	5 (0)
10	49.54 (+1,4)	50 (0)	5 (0)
11	26 (0)	16.36 (-1,4)	5 (0)
12	26 (0)	83.64 (+1,4)	5 (0)
13	26 (0)	50 (0)	1.6 (-1,4)
14	26 (0)	50 (0)	8.3 (+1,4)
15	26 (0)	50 (0)	5 (0)
16	26 (0)	50 (0)	5 (0)
17	26 (0)	50 (0)	5 (0)

2.4 Validação da metodologia

A validação do método foi baseada na definição da linearidade, limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), repetibilidade, precisão intermediária e recuperação.

Para avaliar a linearidade do método, foram preparadas seis soluções com concentrações diferentes, apresentados na Tabela 1, conforme apresentado na seção 1.

As extrações foram realizadas em triplicata e a linearidade foi avaliada pela razão das áreas (área do analito/área do padrão interno) e a concentração de cada analito expressa por regressão linear com coeficientes de determinação (R^2). O LOD e o LOQ foram calculados a partir de 10 extrações independentes do branco, realizadas nas mesmas condições do método, incluindo preparo e análise da amostra.

Para avaliar a repetibilidade, 10 extrações foram realizadas em único dia e para a reprodutibilidade, 10 extrações em dois dias consecutivos, sendo obtido o coeficiente de variação (CV) para cada um dos analitos nas concentrações do nível 1, 3 e 5, da Tabela 1.

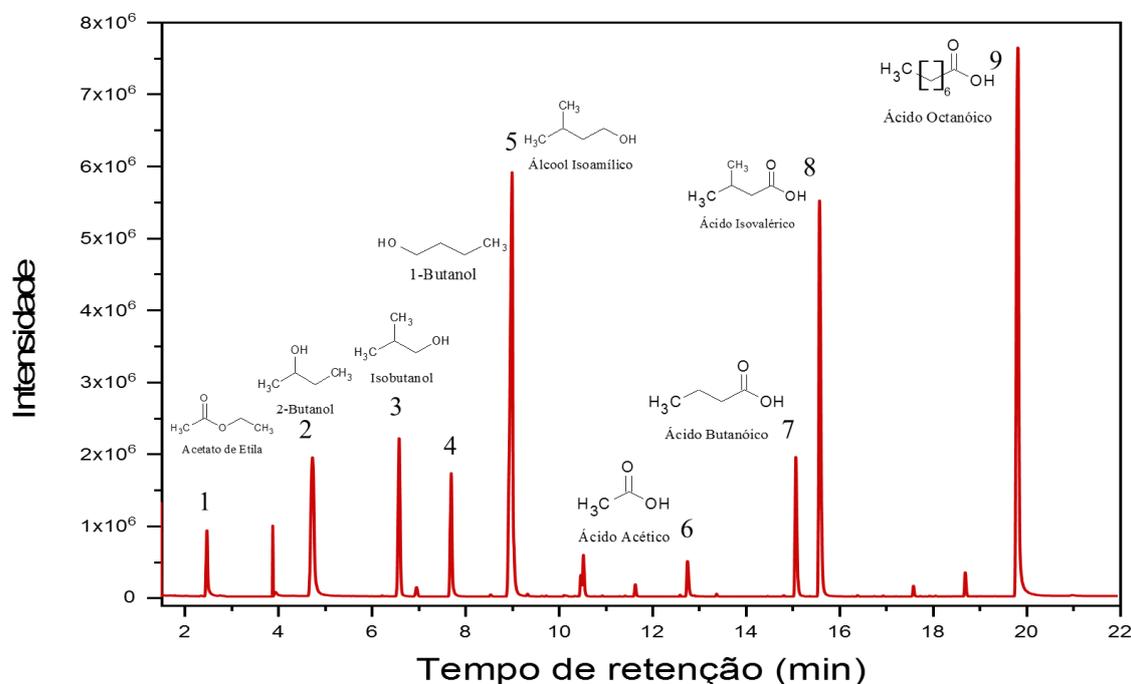
Nos ensaios de recuperação, uma amostra foi enriquecida com dois níveis de concentração, nível 2 e 4, da Tabela 1. Foram realizadas três extrações para cada nível de concentração e a avaliação foi realizada pela porcentagem de recuperação obtida de cada analito.

3 Resultados e Discussão

3.1 Otimização

As condições cromatográficas foram ajustadas de modo a garantir boa resolução cromatográfica, possibilitando a integração adequada dos picos, como evidenciado no cromatograma da Figura 1. Para isso, foi utilizado uma coluna com característica polar e as injeções foram realizadas no modo *split* com razão 1:10. A injeção no nodo *split* leva à limites de detecção maiores, o que não é um problema nesse trabalho visto que o limiar de percepção dos compostos investigados encontra-se em concentrações na faixa de mg L^{-1} . O tempo de dessorção foi de 4 min, buscando garantir que todo o analito extraído fosse transferido para coluna cromatográfica e fosse evitado o efeito memória, em especial aos ácidos carboxílicos de maior ponto de ebulição.

Figura 1 – Cromatogram dos *off-flavours* Acetato de etila, Ácidos (Acético, Butanóico, Octanóico e Isovalérico) e Álcoois superiores (1-Butanol, 2-Butanol, Isobutanol e Isoamílico)

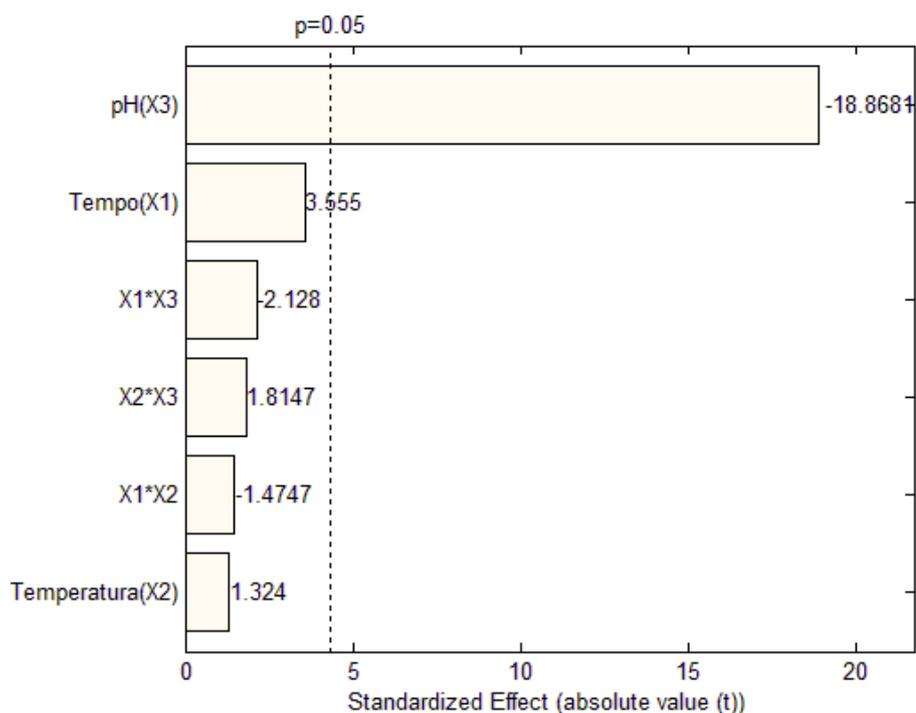


A fim de determinar a melhor condição de extração por HS-SPME, o tempo de extração, o pH das soluções e a temperatura foram otimizados, conforme descrito anteriormente. Todas as extrações foram realizadas com adição de NaCl saturado para garantir maior eficiência da extração devido ao efeito “*salting out*”, sendo esse, o motivo da massa de sal não ser um dos parâmetros avaliados na otimização da extração. A adição de sal geralmente diminui a solubilidade dos analitos na fase aquosa, pois as moléculas de água começam a hidratar os íons dos sais adicionados, favorecendo a passagem dos analitos para o *headspace*, melhorando a extração, como observado anteriormente em análises de voláteis em cerveja (CAJKA *et al.*, 2010; SAISON *et al.*, 2008; STEFANUTO *et al.*, 2017; STERCKX; SAISON; DELVAUX, 2010).

O recobrimento da fibra escolhido foi o PDMS/CAR/DVB, cujo o uso foi relatado anteriormente para a determinação de voláteis em cerveja por SPME (ALVES *et al.*, 2020; PIZARRO; PÉREZ-DEL-NOTARIO; GONZÁLEZ-SÁIZ, 2010). Essa escolha se deve ao fato desse tipo de fibra ser trifásica garantindo a recuperação de voláteis com alta e baixa polaridade. Além disso, o revestimento de CAR tem tamanho de microporo ideal para extrair moléculas pequenas e o DVB apresenta principalmente mesoporos mais adequados para extrair moléculas de tamanho médio.

Inicialmente a condição ótima de extração foi obtida individualmente para cada um dos nove compostos, em seguida, a condição de ótima geral foi obtida levando em consideração as respostas dos nove analitos simultaneamente para cada um dos testes realizados de acordo com as condições definidas pelo planejamento experimental, para isso, foi considerado a média geométrica dos analitos. Um gráfico de pareto indicando as variáveis significativas para a extração dos analitos em um intervalo de confiança de 95% foi obtido e está apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Gráfico de Pareto obtido do planejamento composto central para verificar a influência dos fatores na eficiência de extração de todos os analitos.

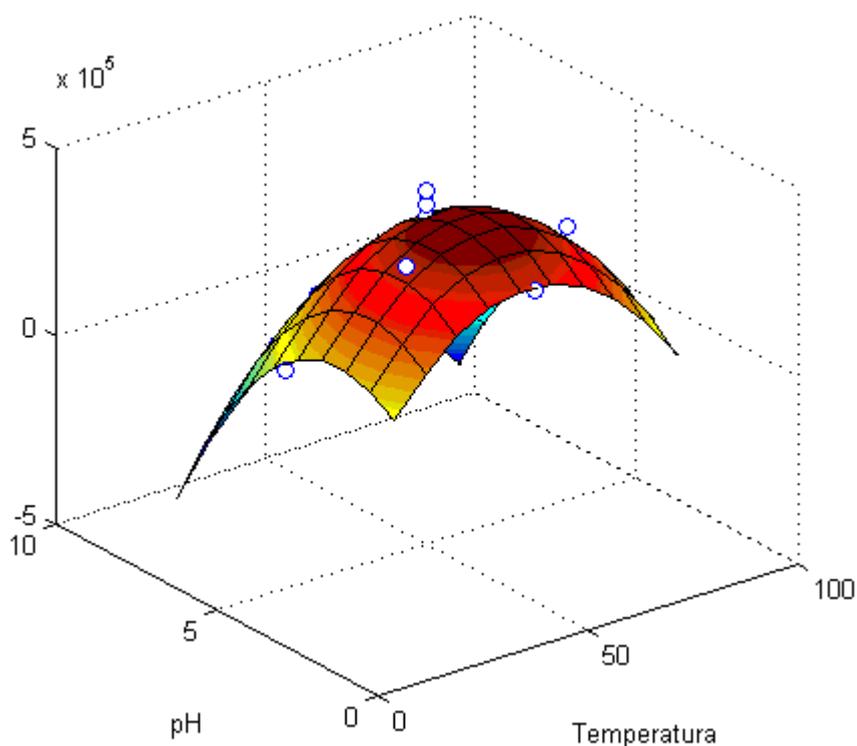


O gráfico de pareto mostra que o pH foi a única variável significativa quando a média geométrica foi usada como resposta. Esse resultado pode ser explicado em função da extração dos ácidos carboxílicos ser favorecida quando tais compostos estão na sua forma não iônica, o que explica que as melhores respostas sejam obtidas para menores valores de pH, já que o pKa dos ácidos avaliados é próximo a 4,8.

Entretanto, quando um gráfico de pareto foi obtido individualmente para cada um dos compostos, foi observado que a temperatura também foi significativa para 7 dos 9 compostos, exceto 1-butanol e isobutanol. A explicação para a temperatura ser significativa para cada composto individualmente e não para a média geométrica está relacionada aos diferentes pontos de ebulição dos compostos. A resposta para

compostos com maior ponto de ebulição melhora com o aumento da temperatura, pois a volatilização dos compostos da matriz é maximizada. Por outro lado, para os compostos com menor ponto de ebulição o aumento da temperatura favorece a dessorção da fibra, diminuindo a resposta. Portanto, como a temperatura é uma variável importante, foi gerada uma superfície resposta com as variáveis pH e temperatura, mostrada na Figura 3, na qual o tempo de extração fixado em 30 min, por ser compatível com o tempo de corrida cromatográfica e para aumentar a frequência analítica.

Figura 3 – Superfície resposta para o planejamento experimental.



Analisando a superfície resposta obtida, é possível constatar que a região ideal para extração abrange valores de pH de 2 a 5 e temperatura de 40 a 70 °C, indicada na região em vermelho escuro na superfície. Como grande parte das amostras de cerveja apresentam pH em torno de 5, o qual está dentro da região ótima, optou-se por utilizar pH 5 nas extrações, eliminando o ajuste de pH. A temperatura de 50 °C foi escolhida como a temperatura ideal, pois garante a extração de todos os analitos e, em temperaturas mais altas, os resultados podem ser afetados pela presença de maior quantidade de etanol no HS e pela dessorção da fibra dos analitos com menor ponto de ebulição.

Assim sendo, as condições ótimas de extração para HS-SPME-GC-MS foram determinadas como sendo em temperatura de extração de 50 °C, 30 minutos de tempo de extração e pH 5. Todas as extrações realizadas para a validação foram realizadas nestas condições, sob agitação a 250 rpm e saturação de sal.

3.2 Validação

A validação do método desenvolvido de HS-SPME-GC-MS foi realizada através da determinação do limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, repetibilidade, precisão intermediária e recuperação de acordo com o guia da EURACHEM, conforme indicado em 2.4 Validação da metodologia.

A partir dos experimentos relatados na Tabela 2, obteve-se a relação linear entre razão das áreas (área do analito/área do padrão interno) e a concentração de cada analito. A partir da curva analítica observou-se que todos os analitos apresentam linearidade com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99 no intervalo avaliado.

Os resultados obtidos para cada analito estão apresentados na Tabela 4, sendo os valores de LOQ e LOD inferiores aos valores de *threshold* (limiar de percepção) dos analitos.

Tabela 4 – Figuras de mérito para a validação do método HS-SPME-GC-MS para a quantificação de *off-flavours* em cerveja.

Analito	Faixa mg L⁻¹	Equação da reta	R²	LOD mg L⁻¹	LOQ mg L⁻¹	Threshold mg L⁻¹
Acetato de Etila	2,5 – 50	$y = 0,3397x + 0,5949$	0,996	0,02	0,06	10
2-Butanol	5,0 – 250	$y = 0,1010x + 0,1559$	0,998	0,62	2,05	100
Isobutanol	5,0 – 250	$y = 0,0581x + 0,0475$	0,997	0,02	0,06	90
1-Butanol	2,5 – 50	$y = 0,0847x - 0,0593$	0,997	0,01	0,03	100
Isoamílico	2,5 – 50	$y = 0,1672x - 0,0415$	0,999	0,02	0,06	1,4
Ácido Acético	12,5 – 500	$y = 0,0023x - 0,0035$	0,996	0,01	0,03	90
Ácido Butanóico	5,0 – 250	$y = 0,0497x + 0,1938$	0,994	0,01	0,03	3
Ácido Isovalérico	5,0 – 250	$y = 0,1191x + 0,69352$	0,992	0,01	0,03	1
Ácido Octanóico	2,5 – 50	$y = 0,3003x + 0,5404$	0,995	0,01	0,03	5

A repetibilidade e a precisão intermediária foram determinadas para avaliar a precisão do método. Para isso calculou-se a coeficiente de variação (CV) em níveis de concentração baixo, médio e alto, sendo observado valores abaixo de 20%, o que indica uma precisão adequada e satisfatória para as amostras analisadas. Assim, como observado por Rosimeire *et al.* (2021), que determinou a presença de hidrocarbonetos aromáticos em cerveja com precisão variando de 3% a 18,7%.

A recuperação foi calculada em cerveja (tipo pilsen) fortificada com dois níveis diferentes de concentração dos analitos. Todos os experimentos foram realizados em 10 repetições e as recuperações variaram de 70% a 120%, valores esperados para amostras complexas, assim como foi obtido por Bustillo *et al.* (2019), na determinação de aldeídos cisteinilados em maltes e cervejas, que as recuperações variaram de 112% a 120%. Os resultados da precisão e recuperação do método são apresentados na Tabela 5.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4 e na Tabela 5, o método proposto para determinação simultânea de 9 compostos das classes éster, ácidos e álcoois em amostras de cerveja mostra-se adequado e apresenta boa aplicabilidade.

Tabela 5 – Resultados da validação da precisão e recuperação.

Analito	Repetibilidade			Precisão Intermediária			Recuperação	
	CV (%)			CV (%)			(%)	
Nível	2	4	7	2	4	7	3	5
Acetato de Etila	15,93	14,80	14,95	12,59	12,45	9,10	89,77	82,57
2-Butanol	18,90	10,99	13,56	13,36	10,94	11,14	96,44	81,10
Isobutanol	17,92	10,55	13,49	13,38	10,31	10,12	106,29	84,36
1-Butanol	18,39	9,12	12,37	13,79	11,70	9,77	120,84	84,22
Isoamílico	14,12	7,64	9,32	11,07	11,02	7,95	112,66	112,64
Ácido Acético	17,67	13,84	16,68	19,00	10,54	15,23	74,41	70,49
Ácido Butanóico	18,96	19,76	15,05	17,27	13,56	12,15	91,20	70,12
Ácido Isovalérico	17,19	15,68	14,84	16,95	10,27	10,20	78,07	70,04
Ácido Octanóico	19,70	13,88	15,89	18,75	15,26	10,39	96,91	88,24

3.3 Amostras

Após a validação, o método foi aplicado para análise de 17 cervejas de estilos diferentes, sendo elas fabricadas por grandes cervejarias (A até D), microcervejarias (E até K) e por cervejeiros caseiros (L até Q), sendo os resultados apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Concentrações em (mg L⁻¹) e desvio padrão dos analitos nas amostras de cerveja analisadas por HS-SPME-GC-MS.
(n=3, exceto para G e K).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	
1	11,93 (0,09)	0,59 (0,82)	15,41 (0,70)	7,72 (0,49)	30,45 (3,70)	94,37 (1,37)	84,64	39,40 (0,45)	122,58 (11,92)	51,34 (1,72)	25,38	34,99 (2,97)	26,66 (0,63)	65,39 (12,16)	11,98 (0,02)	123,26 (0,59)	73,43 (13,09)	
2	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
3	0,45 (0,01)	< LOD	0,52 (0,04)	< LOD	23,64 (0,33)	48,11 (0,21)	11,09	19,09 (0,02)	31,53 (1,65)	15,69 (0,57)	0,60	3,14 (0,20)	3,90 (0,04)	10,20 (1,24)	57,27 (0,04)	5,14 (0,08)	11,57 (1,44)	
4	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	
5	17,29 (0,00)	< LOD	16,47 (0,34)	6,75 (0,23)	68,41 (1,74)	< LOD	68,87	53,98 (0,22)	106,07 (5,48)	87,73 (2,52)	30,00	30,21 (0,88)	26,03 (0,31)	47,10 (3,56)	75,11 (0,29)	53,42 (1,14)	53,50 (4,45)	
6	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	184,45 (0,08)	430,93 (0,06)	0,23	124,11 (0,00)	1,35 (0,30)	0,61 (0,10)	2,03	< LOD	< LOD	< LOD	80,84 (0,03)	0,67 (0,07)	0,53 (0,18)	
7	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,70 (0,04)	1,35 (0,31)	0,00	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,22 (0,02)	< LOD
8	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,40	< LOD	< LOD	0,72 (0,04)	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0,49 (0,01)	0,19 (0,19)
9	5,99 (0,26)	0,53 (0,18)	5,26 (0,03)	4,57 (0,67)	40,72 (2,43)	29,94 (0,74)	15,82	39,95 (0,45)	27,81 (3,26)	11,09 (1,47)	33,81	39,11 (1,48)	30,84 (0,60)	48,04 (6,16)	17,40 (0,93)	101,37 (5,48)	47,69 (6,05)	

1. Acetato de Etila; 2. 2-Butanol; 3. Álcool Isobutanol; 4. 1-Butanol; 5. Álcool Isoamílico; 6. Ácido Acético; 7. Ácido Butanóico; 8. Ácido Isovalérico e 9. Ácido Octanóico.

Observa-se a presença de acetato de etila em todas as cervejas analisadas, com concentrações de 0,59 a 123,26 mg L⁻¹, sendo que 15 das 17 cervejas apresentam concentração maior ao limiar de percepção na cerveja que é de 5-10 mg L⁻¹. Este composto é proveniente da esterificação dos álcoois e ácidos graxos ativados pela coenzima A, o qual, em baixas concentrações, fornece um sabor frutado de pera à cerveja e em altas concentrações pode provocar um sabor de solvente ou acetona. As menores concentrações para o acetato de etila foram observadas nas cervejas do tipo *Lagers*, cuja fermentação é realizada em temperaturas mais baixas e na presença de uma levedura que produz menos ésteres. Em cervejas do tipo *Ale*, cuja fermentação ocorre em temperaturas maiores, a presença de acetato de etila é maior, pois quanto maior a temperatura de fermentação, mais rapidamente crescem as leveduras e maior quantidade de ésteres serão formados (BARTH, 2013; DACK *et al.*, 2017).

Os álcoois superiores são subprodutos provenientes da má fermentação da cerveja. Em baixas concentrações promovem um sabor semelhante ao etanol, já em altas concentrações, um sabor de solvente. Nas 17 cervejas analisadas as concentrações de 1-butanol e 2-butanol estiveram abaixo do LOQ. A presença de isobutanol e de isoamílico foi observada em quase todas as cervejas analisadas, nas quais as concentrações variaram de 0,45 a 57,27 mg L⁻¹ para o isobutanol e de 6,75 a 106,07 mg L⁻¹ para o álcool isoamílico. Para todas as cervejas analisadas a concentração do álcool isoamílico estava acima do limiar de percepção, uma vez que o limiar desse analito na cerveja é de 1,4 mg L⁻¹. Observou-se ainda que as cervejas produzidas em escala industrial apresentaram valores menores que as cervejas produzidas em microcervejarias e por cervejeiros caseiros. A baixa taxa de inóculo de leveduras, temperatura elevada e alta taxa de aeração podem levar ao estresse da levedura e, por consequência, à formação desses subprodutos, o que deve ocorrer menos em grandes cervejarias, sendo uma explicação para a diferença entre os dois grupos de amostras (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Os ácidos carboxílicos são formados durante a fermentação, por exemplo, pela oxidação do etanol, sendo inevitável a sua presença. Porém a quantidade presente nas cervejas proporciona um sabor aceitável quando abaixo do limiar de percepção e, por outro lado, desagradável quando a concentração é superior ao limiar de percepção. Grandes quantidades desses ácidos podem estar relacionadas à má sanitização dos equipamentos, tempo excessivo de mosturação, uso de fermento de baixa vitalidade ou falta de controle das condições de fermentação, maturação e armazenamento

(HORNINK; GALEMBECK, 2019), sendo a determinação desses compostos importante para averiguar falhas no processo cervejeiro.

O ácido octanóico foi determinado em todas as amostras, cujas concentrações variaram de 0,53 a 48,04 mg L⁻¹, enquanto que o ácido acético foi quantificado em 10 das 18 amostras com concentrações de 0,23 a 430,0 mg L⁻¹. A presença de ácido acético em algumas amostras pode ser justificada pelo crescimento excessivo de leveduras, bactérias contaminantes e leveduras selvagens. Além disso, o sabor acético é um problema comum nas cervejas vendidas em *craft station*, resultante do crescimento de bactérias contaminantes como a *Acetobacter* e a *Gluconobacter*. Já os ácidos butanóico e isovalérico foram quantificados em apenas em 3 e 4 amostras, com concentrações variando de 0,22 a 1,35 mg L⁻¹ e de 0,19 a 0,72 mg L⁻¹, respectivamente. A presença desses ácidos na cerveja pode provocar diferentes aromas: o ácido octanóico fornece um aroma de sabão e queijo de cabra, o ácido acético um aroma característico de vinagre, enquanto que o ácido butanóico remete a um aroma de vômito de criança e leite azedo e o ácido isovalérico um aroma de queijo (HORNINK; GALEMBECK, 2019).

4 Conclusões

O método HS-SPME-GC-MS foi otimizado e validado para a determinação de álcoois, ácidos carboxílicos e acetato de etila em cervejas industriais e artesanais. Foram determinadas as condições ideais para três parâmetros de extração em um delineamento de composto central. As condições escolhidas para a extração foram temperatura de 50 °C, tempo de extração de 30 min e pH 5. As curvas de calibração foram realizadas nessas condições e a precisão do método foi verificada. O método otimizado foi utilizado para a determinação de 9 substâncias voláteis em 17 cervejas. Assim, foi demonstrado que o uso de HS-SPME-GC-MS resultou em um método exato e preciso para a análise dos compostos voláteis da cerveja, cujos resultados podem ser usados para investigar erros no processo de produção da cerveja.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudo de A. A. Gonçalves e L. F. Pereira, a Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro e à Central de Análises e

Prospecção Química (CAPQ) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela cessão das instalações e equipamentos para a realização deste trabalho.

5 Referências Bibliográficas

ALMEIDA, N. E. C.; AGUIAR, I.; CARDOSO, D. R. Mechanism of Hop-Derived Terpenes Oxidation in Beer. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 11, p. 2362-2368, 2015.

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

BARTH, R. The chemistry of beer: the science in the suds. **John Wiley & Sons**, p. 172-173, 2013.

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The microbiology of malting and brewing. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 77, n. 2, p. 157-72, 2013.

BUSTILLO TRUEBA, P. *et al.* Validation of an ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantification of cysteinylated aldehydes and application to malt and beer samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1604, p. 460-467, 2019.

CAJKA, T. *et al.* Recognition of beer brand based on multivariate analysis of volatile fingerprint. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 25, p. 4195-4203, 2010/06/18/2010.

CALLEJÓN, R. M. *et al.* Recent developments in the analysis of musty odour compounds in water and wine: A review. **Journal of Chromatography A**, v. 1428, p. 72-85, 2016.

COELHO, E. *et al.* Volatile fingerprinting differentiates diverse-aged craft beers. **LWT**, v. 108, p. 129-136, 2019.

DA SILVA, G. C. *et al.* Method development by GC-ECD and HS-SPME-GC-MS for beer volatile analysis. **Food Chemistry**, v. 167, p. 71-77, 2015.

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.

EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods, ed. 2. 20144. <www.eurachem.org>. acessado em 20 jun. 2021.

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, p. 103991, 2019.

GONZALEZ VIEJO, C. *et al.* Development of a low-cost e-nose to assess aroma profiles: An artificial intelligence application to assess beer quality. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 308, p. 127688, 2020.

GUIDO, L. F. Sulfites in beer: reviewing regulation, analysis and role. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 2, p. 189-197, 2015.

HORÁK, T. *et al.* Determination of free medium-chain fatty acids in beer by stir bar sorptive extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1196-1197, p. 96-99, 2008.

HORNINK, G. G.; GALEMBECK, G. **Glossário cervejeiro: da cultura à ciência**. Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL: 2019.

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

MA, C. *et al.* Analysis of flavour compounds in beer with extruded sorghum as an adjunct using headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 2, p. 251-260, 2016.

PIZARRO, C.; PÉREZ-DEL-NOTARIO, N.; GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M. Optimisation of a simple and reliable method based on headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile phenols in beer. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 39, p. 6013-6021, 2010.

PORTEA, A.; PORTEB, L. H. M.; OLIVEIRA, L. M. Cromatografia gasosa quiral na resolução de enantiômeros envolvidos em flavours de frutas. **Química Nova**, v. 37, p. 1670-1679, 2014.

SANTOS, R. R. *et al.* Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons and derivatives in beer using a new cold fiber-solid phase microextraction system. **Food Control**, v. 126, p. 104-108, 2021.

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, n. 1-2, p. 342-349, 2008.

STEFANUTO, P. H. *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, 2017.

STERCKX, F. L.; SAISON, D.; DELVAUX, F. R. Determination of volatile monophenols in beer using acetylation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 676, n. 1, p. 53-59, 2010.

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, p. 126466, 2020.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast The Practical Guide to Beer Fermentation.**
Boulder: Brewers Publications. 2010.

ARTIGO 2**Otimização e validação de metodologia para determinação de ftalatos por HS-SPME-GC-MS em cervejas caseiras e industriais**

Andressa Aparecida Gonçalves^{a*}, André Cunha Paiva^b, Letícia Fagundes Pereira^a,
Stanislau Bogusz Júnior^c, Leandro Wang Hantao^b, Márcio Pozzobon Pedroso^{a*}

^aLaboratório de Pesquisa em Química Analítica, Departamento de Química,
Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil

^bLC-GC, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP,
Brasil

^cInstituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brasil

*Corresponding author.

E-mail: andressa.goncalves91@yahoo.com.br

marciopedroso@ufla.br

Resumo

A presença de ftalatos em bebidas pode decorrer da sua migração de plásticos usados ao longo do processo de produção ou da armazenagem, por serem classificados como desreguladores endócrinos. Nos últimos anos o Brasil apresentou um aumento do número de micro e nanocervejarias, das quais algumas utilizam recipientes plásticos para envase. Esse aumento no número de cervejarias também impulsionou o aumento da produção de cerveja caseira no Brasil, nas quais muitas vezes são usados materiais plásticos não adequados para fins alimentícios são utilizados na produção da cerveja. Diante disso, torna-se importante a detecção de ftalatos em nessas amostras. Assim, considerando a possível presença desses compostos em cervejas, um método para a determinação de dimetil ftalato, dietil ftalato, diisobutil ftalato, dibutil ftalato e di-2-etilhexil ftalato em cerveja foi desenvolvido usando microextração em fase sólida através do *headspace* (HS-SPME) combinada com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). A ocorrência de ftalatos foi avaliada em 33 cervejas brasileiras envasadas em diferentes recipientes (lata, plásticos e vidro) e com produção industrial ou caseira. As condições de HS-SPME foram otimizadas por planejamento composto central (CCD) e da metodologia de superfície de resposta, determinando os parâmetros de extração à 70 ° C por 40 min. O método validado apresentou boa linearidade com coeficientes de determinação acima de 0,99 e valores satisfatórios de repetibilidade (6,3% a 15,9%), precisão intermediária (5,6% a 16,6%) e recuperação (88% a 112%). Foi encontrada a presença de ftalatos em concentrações acima do LOD em cerca de 48% das amostras analisadas, sendo que a maioria dessas eram cervejas armazenadas em embalagens plásticas ou cervejas produzidas por cervejeiros caseiros. Através desse estudo não foi possível precisar a origem exata dos ftalatos nas cervejas, contudo, as amostras caseiras apresentaram maior quantidade de ftalatos, provavelmente, devido ao uso de material não destinado a fins alimentícios ao longo do processo.

Palavras-chave: Cerveja; Ftalatos; HS-SPME; GC-MS; Desreguladores endócrinos.

1 Introdução

Os ésteres do ácido ftálico, ou ftalatos, são um grupo de compostos sintéticos produzidos em grande escala, com ampla variedade de aplicações os ramos industriais, agrícolas e domésticas, destacando o uso como plastificantes em polímeros como o cloreto de polivinila (PVC), promovendo flexibilidade, resistência e durabilidade do

plástico. Os ftalatos não estão quimicamente ligados ao polímero, mas apenas fisicamente e, portanto, podem migrar facilmente dos materiais plásticos para o ambiente e até mesmo para os alimentos e bebidas em contato com eles (HUANG *et al.*, 2021).

Como agravante dessa migração, tem-se o fato de que os ftalatos são considerados desreguladores endócrinos, apresentando propriedades cancerígenas e potencialmente tóxicas à saúde humana. Apesar dos ftalatos serem encontrados em níveis traços, o risco associado às doses mínimas de contaminantes são perceptíveis e os efeitos tóxicos sutis podem se agravar ao longo do tempo em uma combinação de efeito aditivo que não pode ser previsto adequadamente considerando cada agente individual. Em última análise, a exposição a contaminantes químicos perigosos deve ser minimizada sempre que possível, com todas as rotas de exposição levadas em consideração, incluindo a ingestão de bebidas alcoólicas (HE; BAYEN, 2020; HUANG *et al.*, 2021).

A principal fonte de contaminação de ftalatos em humanos se deve a ingestão de alimentos contaminados, que pode ser proveniente do contato dos produtos com materiais plásticos durante a sua produção ou até mesmo do contato direto com embalagens para alimentos que apresentam material plástico em sua composição (CAO, 2010). A presença de ftalatos vem sendo detectada em diferentes produtos alimentícios como em água (ERDEM *et al.*, 2021; FARAJZADEH *et al.*, 2015; LUKS-BETLEJ *et al.*, 2015; RUSSO *et al.*, 2014), leite (CAO, 2010; FENG; ZHU; SENSENSTEIN, 2005; SAJID *et al.*, 2016), óleos vegetais (HOLADOVÁ *et al.*, 2007), vinho (HE; BAIEN, 2020; PERESTRELO *et al.*, 2020; RUSSO *et al.*, 2014) e cerveja (LI *et al.*, 2013; PANG *et al.*, 2020). A principal fonte de contaminação de ftalatos em humanos se deve a ingestão de alimentos contaminados, que pode ser proveniente do contato dos produtos com materiais plásticos durante a sua produção ou até mesmo do contato direto com embalagens para alimentos que apresentam material plástico em sua composição (CAO, 2010).

A cerveja se caracteriza por ser uma bebida produzida, basicamente, a partir de água, cevada, lúpulo e leveduras e é considerada uma das bebidas alcoólicas mais consumida em todo mundo (HE; BAYEN, 2020). A contaminação da cerveja por ftalatos, pode ser proveniente das matérias-primas utilizadas, da presença de materiais plásticos nos equipamentos de produção, da composição do material de envase e das condições de armazenamento. Os equipamentos utilizados na indústria cervejeira são

constituídos em sua maioria de aço inox, sendo pouco provável a presença de material plástico durante a produção da cerveja. Já na produção caseira de cerveja, a presença de materiais plásticos pode ser observada de forma diversificada nas etapas de produção, como em fermentador, conectores, torneiras, mangueiras e recipiente para envase, sendo recomendado o uso de materiais plásticos de grau alimentício. O envase da cerveja industrial é realizada, em sua maioria, em latas de alumínio ou em garrafas de vidro com tampa de metal com vedação interna de um material plástico, comumente o PVC. Além dessas formas, atualmente vem se popularizando o uso de *growlers* de vidro, de cerâmica ou de plástico para envase de cervejas produzidas em casa ou adquiridas em microcervejarias (BRATU *et al.*, 2021).

Apesar dos ftalatos serem compostos hidrofóbicos, a sua migração de materiais plásticos para alimentos e bebidas se torna possível devido à presença de algum óleo livre ou de solventes, como o etanol, promovendo a presença de ftalatos nessas amostras (COUSINS; MACKAY, 2000). Assim, a possibilidade da presença desses compostos em uma bebida altamente consumida no mundo, como a cerveja, acarretou na necessidade do desenvolvimento de métodos analíticos confiáveis capazes de qualificar e quantificar os ftalatos em cerveja.

A determinação dos ftalatos em uma amostra complexa como a cerveja pode ser realizada utilizando um método baseado em microextração em fase sólida através do *headspace* combinada com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (HS-SPME-GC-MS), possibilitando a separação, identificação e a quantificação dos ftalatos, como foi realizado por Carnol *et al.*, (2017). As cervejas analisadas foram envasadas em vidro ou alumínio e foi detectada a presença de ftalatos, cujo somatório variou de 7 a 37 $\mu\text{g L}^{-1}$ em latas e de 0,6 a 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ em garrafas de vidro. As garrafas tinham uma tampa com uma gaxeta (ou vedante) e as latas eram revestidas internamente com o mesmo material. Os resultados parecem indicar que a produção é a fonte predominante de contaminação, mas as matérias primas também podem ser possíveis fontes de contaminação (CARNOL *et al.*, 2017). Entretanto, não há nenhuma informação sobre a concentração de ftalatos em amostras de cervejas envasadas em plásticos e em cervejas caseiras, nas quais há um maior contato com plásticos em relação às amostras industriais, e também há a possibilidade de uso de equipamentos com materiais não destinados à alimentos.

Assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver um método eficiente, sensível e preciso para a detecção simultânea de dimetil ftalato (DMP), dietil ftalato (DEP),

diisobutil ftalato (DiBP), dibutil ftalato (DBP) e bis(2-etilhexil)ftalato (DEHP) por HS-SPME-GC-MS em cervejas industriais e caseiras, envasadas em plásticos, vidros e alumínio, através da otimização do revestimento da fibra utilizada, de otimização multivariada dos parâmetros de extração (tempo e temperatura) e da validação pela avaliação da linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ). Com o método validado, as amostras foram analisadas e foram submetidas à Análise de Componentes Principais (PCA) com o intuito de investigar diferenças entre as amostras e possíveis relações entre a presença dos diferentes ftalatos com o processo de fabricação e envase das cervejas.

2 Materiais e Métodos

2.1 Instrumentação

Os testes iniciais e as análises cromatográficas do planejamento do tipo composto central foram realizadas em um cromatógrafo a gás com detecção por espectrometria de massas, modelo QP2010 Plus da Shimadzu (Shimadzu, Japão) no laboratório do Centro de Análise e Prospecção Química (CAPQ), no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

A validação da metodologia e a análise das amostras de cerveja foram realizadas em um cromatógrafo a gás TRACE 1310 acoplado ao espectrômetro de massa Q Exactive FT-Orbitrap (ThermoFisher Scientific, Austin, TX, USA) no LC-GC do Instituto de Química, no Departamento de Química Analítica da Universidade Estadual de Campinas (IQ-UNICAMP).

2.1 Reagentes e amostras

Foram empregados os padrões de DMP, DEP, DiBP, DBP e DEHP adquiridos da Sigma-Aldrich, todos com pureza 99,0% e Álcool Etílico (99,9%) adequado para análises por GC-MS. As fibras utilizadas foram as revestidas de poliacrilato (PA), divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) e polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB), adquiridas da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

Uma solução estoque de 1000 mg L⁻¹ contendo DMP, DEP, DiBP, DBP e DEHP foi preparada em álcool etílico, sendo empregada a massa do soluto e a densidade das soluções para obter a concentração exata de cada analito na solução estoque. Em seguida soluções intermediárias foram preparadas em solução alcoólica 5% (v/v) em

concentrações de 20 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹ e 0,12 mg L⁻¹. Em função da massa pesada para cada ftalato, a concentração exata difere ligeiramente entre cada analito. A partir das soluções intermediárias seis soluções-padrão foram preparados para a curva analítica apresentada na Tabela 1.

Tabela 7 – Concentrações das soluções-padrão para construção da curva analítica (em µg L⁻¹).

Analito	Nível 1	Nível 2	Nível 3	Nível 4	Nível 5	Nível 6
DMP	15,30	30,60	40,80	81,60	163,20	204,00
DEP	15,00	30,0	40,00	80,00	160,00	200,00
DiBP	11,60	23,20	30,20	58,00	92,80	116,00
DBP	11,80	23,60	30,70	47,20	94,40	188,80
DEE	18,80	37,50	50,00	100,00	200,00	250,00

2.2 HS-SPME e GC-MS

As extrações foram realizadas por HS-SPME empregando 5 mL de amostra e aquecimento.

As análises cromatográficas realizadas no CAPQ/UFLA foram realizadas sob fluxo de 1,0 mL min⁻¹ de gás Hélio (99,999%). Uma coluna capilar de baixo sangramento Rt-5MS 30 m × 0,25 mm-id (espessura de filme de 0,25 µm) foi usada em todos os experimentos. O injetor foi operado no modo *splitless*, à uma temperatura de 265 °C. A programação de aquecimento do forno do GC foi de 80 °C (mantida por 5 min) até 220 °C numa taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ e até 290 °C (mantida por 4 min) numa taxa de aquecimento de 30 °C min⁻¹. O espectrômetro de massas foi operado no modo monitoramento seletivo (SIM), com ionização por elétrons (EI) e energia de 70 eV. A temperatura da fonte de íons foi de 200 °C e a temperatura de interface de 240 °C.

Nas análises realizadas no IQ-UNICAMP o injetor do GC foi operado no modo *splitless* a 265 °C. O hélio foi usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo constante de 1,2 mL min⁻¹. Uma coluna capilar de baixo sangramento SLB-IL60i (30m x 0,25 mm-id x 0,25 µm). O forno GC foi programado de 170 °C (mantida por 0,5 min) a 280 °C a uma taxa de aquecimento de 6 °C min⁻¹.

A ionização química em modo positivo (PCI) foi realizada utilizando metano a 1,5 mL min⁻¹. A fonte de íons e a linha de transferência foram mantidas a 200 °C e 250

°C, respectivamente. Uma largura total na metade da potência máxima de resolução (FWHM) de 60.000 (m/z 200) foi usada. O método C-trap operou com um controle automático de ganho (AGC) de 2×10^5 e o tempo de injeção de íons (IT) foi definido como automático.

2.3 Otimização SPME

A extração foi realizada no modo *headspace*. As extrações realizadas por HS-SPME inicialmente foram realizadas a fim de determinar o melhor revestimento das fibras, sendo avaliados os recobrimentos de PA, PDMS/DVB e PDMS/DVB/CAR para a extração dos ftalatos DMP, DEP, DiBP, DBP e DEHP. Para isso, foram utilizados 5 mL da solução de ftalatos em concentrações de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de DMP, DEP, DEHP e $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ DiBP e DBP, as extrações foram realizadas a $70 \text{ }^\circ\text{C}$ por 40 minutos e a dessorção foi realizada por 5 minutos no injetor.

Após a escolha da fibra que proporciona a melhor extração, passou-se para a otimização das condições para a extração simultânea dos cinco ftalatos em cerveja por HS-SPME. A otimização foi realizada por um estudo multivariado, no qual foram otimizados o tempo e a temperatura. Um CCD foi realizado, com três repetições no ponto central, o planejamento foi realizado utilizando o *software* Chemoface e as condições geradas estão dispostas na Tabela 2. Para a realização de todas as extrações foram empregados 5 mL de solução na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de DMP e DEP, $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de DiBP e $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de DEHP.

Tabela 2 – Condições experimentais do CCD para tempo e temperatura.

Teste	Tempo (min)	Temperatura (° C)
1	20 (-1)	43 (-1)
2	20 (-1)	65 (+1)
3	60 (+1)	43 (-1)
4	60 (+1)	65 (+1)
5	11,7 (-1,4)	54 (+1)
6	68,2 (+1,4)	54 (+1)
7	40 (0)	38,4 (-1,4)
8	40 (0)	69,5 (+1,4)
9	40 (0)	54 (0)
10	40 (0)	54 (0)
11	40 (0)	54 (0)

A condição ótima para extração foi obtida através de um gráfico de superfície de resposta na qual média geométrica das áreas dos analitos foi adotada como resposta.

2.4 Validação da metodologia

A validação do método consistiu em definir linearidade, limites de detecção (LOD), limites de quantificação (LOQ), precisão e exatidão. Para avaliar a linearidade do método, foram preparadas seis soluções em concentrações diferentes apresentadas na Tabela 1. As extrações foram realizadas em triplicata e a linearidade foi avaliada pelas áreas obtidas e a concentração de cada analito expressa por regressão linear com coeficientes de correlação (R^2). A partir dos parâmetros obtidos da curva analítica foi possível estimar os valores do LOD e do LOQ.

A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária, para isso foi determinado o coeficiente de variação (CV) para cada um dos analitos a partir de 6 extrações realizadas em único dia e 3 extrações em dois dias consecutivos, sendo obtido o CV para cada um dos analitos em níveis de concentrações baixa (5,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ DMP; 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DEP; 5,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ DiBP; 5,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ DBP e 6,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ DEHP), média (51,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DMP; 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DEP; 58,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DiBP; 59,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DBP e 63,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DEHP) e alta (204,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DMP; 200,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DEP; 232,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DiBP; 236,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DBP e 250,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DEHP).

A avaliação da exatidão foi realizada pelo ensaio de recuperação. Uma amostra de cerveja na qual a concentração de todos os ftalatos foi inferior ao LOD foi enriquecida em dois níveis de concentração, média (26,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ DMP; 26,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DEP; 30,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ DiBP; 30,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ DBP e 32,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ DEHP) e alta (81,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ DMP; 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ DEP; 92,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ DiBP; 94,4 $\mu\text{g L}^{-1}$ DBP e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de DEHP). Foram realizadas três extrações para cada nível de concentração e a avaliação foi realizada pela porcentagem de exatidão obtida de cada analito a partir da razão entre o valor predito e o valor verdadeiro.

2.5 Amostras

Trinta e três amostras de cervejas de diferentes estilos foram analisadas, das quais vinte e duas amostras foram produzidas industrialmente (treze de grandes cervejarias e nove em microcervejarias) e onze amostras produzidas de forma caseira. Todas as amostras foram armazenadas a $8 \pm 2^\circ\text{C}$ e degaseificadas em banho ultrassônico por 8 minutos, antes das extrações.

Para as amostras produzidas por cervejeiros caseiros, um questionário foi disponibilizado virtualmente sobre os materiais utilizados na produção das cervejas doadas para a pesquisa, de modo a possibilitar uma relação entre os materiais plásticos que entraram em contato com as cervejas e a presença de ftalatos nas mesmas. Este questionário torna-se dispensável para as grandes e micro cervejarias. O formulário encontra-se como material suplementar (S1) e as respostas dos formulários para todas as amostras foi transformada em tabela, também disponibilizada como material suplementar (S2).

2.6 Análise de PCA

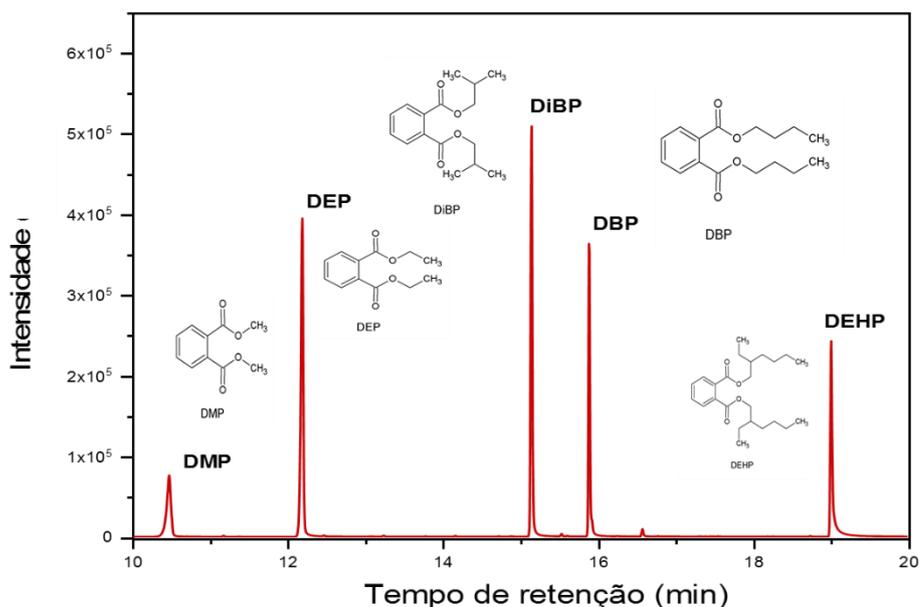
As concentrações de DMP, DEP, DiBP, DBP e DEHP presentes em cada uma das trinta e três amostras foram usadas para realização da análise de PCA, a fim de avaliar semelhanças entre as variáveis analisadas. As análises quimiométricas foram realizadas com o *software* Chemoface e a matriz de dados foi construída para 33 amostras e 5 variáveis, sendo que valores inferiores ao LOD foram substituídos por zero.

3 Resultados e Discussão

3.1 Otimização

As condições cromatográficas foram ajustadas de modo a garantir boa resolução cromatográfica, possibilitando a integração adequada dos picos, como evidenciado no cromatograma da Figura 1.

Figura 1 – Cromatograma dos ftalatos: Dimetil ftalato (DMP), Dietil ftalato (DEP), Diisobutil ftalato (DiBP), Dibutil ftalato (DBP) e Dietilhexil ftalato (DEHP).



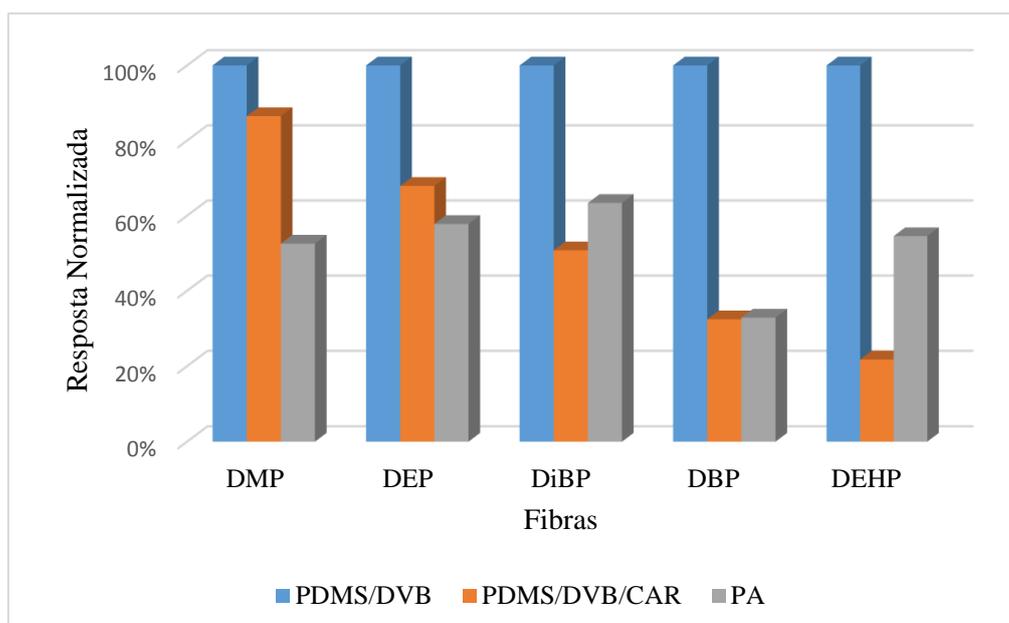
A otimização de uma metodologia para a determinação de ftalatos em cerveja pode ser considerada complicada. Assim, a extração por SPME através do *headspace* é a forma mais indicada, pois evita contaminação e danos à fibra, aumentando sua vida útil. Por outro lado, ftalatos são compostos com baixa pressão de vapor, caracterizando uma baixa transferência para a fase de vapor, o que sugere que a extração pelo modo de imersão direta na amostra seja mais eficiente. Apesar disso, o aumento da temperatura durante a extração aumenta a pressão de vapor dos analitos, melhora a transferência de massa e aumenta a constante de distribuição *headspace*/amostra, viabilizando esse tipo de extração (COUSINS; MACKAY, 2000; JAGIRANI; SOYLAK, 2020).

Além da temperatura, outros fatores podem ser considerados visando melhores eficiências de extração. Nesse sentido, foram avaliados três recobrimentos de fibra (PA, PDMS/DVB e PDMS/DVB/CAR), compreendendo os dois tipos de fibras disponíveis comercialmente, as do tipo absorventes e as do tipo adsorventes. A extração com fibras do tipo absorvente, é baseada na partição de analitos, além disso, a espessura do revestimento e o peso molecular dos analitos influenciam na eficiência de extração. Já a extração com fibras do tipo adsorventes é baseada na adsorção, assim a superfície da

partícula interage fisicamente com os analitos, por meio do efeito de Van der Waals e Ligações de Hidrogênio (PARREIRA; CARDEAL, 2005; FARAJZADE; SOROURADDIN; AFSHAR, 2015; JAGIRANI; SOYLAK, 2020).

A comparação entre as fibras foi feita a partir da integração das áreas dos picos dos ftalatos e pode-se construir o gráfico ilustrado na Figura 2. Para facilitar a visualização, o maior valor de área de pico para cada composto foi atribuído o valor de 100%, sendo os demais valores normalizados em função de suas áreas. Assim, é possível notar claramente a diferença de extração entre as fibras avaliadas, evidenciando que para todos os ftalatos avaliados a fibra de PDMS/DVB apresentou melhor eficiência de extração, assim como observado por Carnol *et al.* (2017). Com relação as extrações a partir dessa fibra, a fase de PDMS atua por absorção e tem característica apolar, já a fase de DVB aumenta a polaridade do material de extração, contribuindo para a extração dos analitos. A fibra PDMS/DVB/CAR, além dessas duas fases, apresenta também a fase CAR, um tipo de carvão ativo finamente particulado, acrescenta o fenômeno de adsorção à dinâmica da extração dos voláteis, o que não é indicado para os compostos em questão e poderia acarretar efeito de memória entre as extrações (LUKS-BETLEJ *et al.*, 2001).

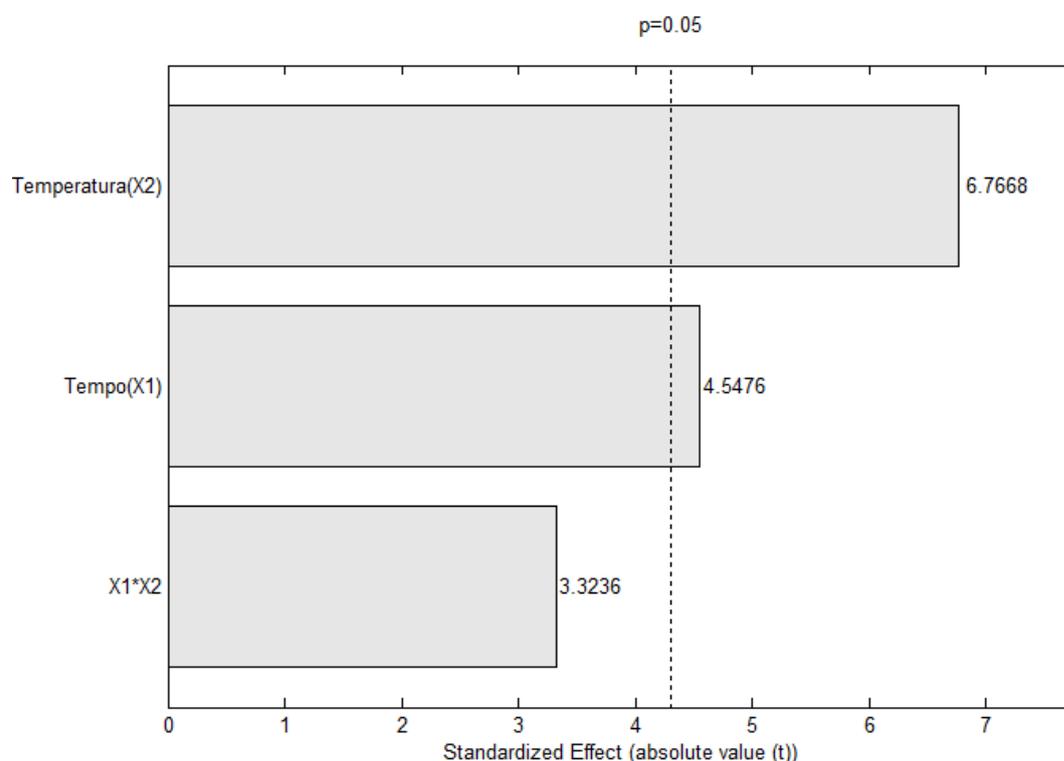
Figura 2 – Comparação das áreas dos picos dos ftalatos por extrações com as fibras PDMS/DVB, PDMS/DVB/CAR e PA.



Sendo a fibra de PDMS/DVB determinada como a mais eficiente para a determinação de DMP, DEP, DiBP, DBP e DEHP em cervejas, ela foi selecionada para

a realização da otimização de extração. Foram avaliados o tempo e a temperatura de extração e a média geométrica das áreas dos picos dos analitos foi empregada como resposta de cada experimento, com o intuito de se obter uma condição satisfatória de extração para os cinco ftalatos simultaneamente. A degaseificação das amostras não foi avaliada, uma vez que já há trabalhos indicando que não há influência significativa desse parâmetro (PIZARRO; PÉREZ-DEL-NOTARIO; GONZÁLEZ-SÁIZ, 2010; VIEIRA *et al.*, 2020). Além disso, a adição de NaCl, empregada para aumentar a volatilização dos compostos através do efeito *salting-out*, bem como o ajuste de pH das amostras não foram avaliados na otimização da extração, uma vez que os reagentes que seriam empregados apresentavam ftalatos como contaminantes e poderiam contaminar as amostras. Um gráfico de Pareto indicando as variáveis significativas para a extração dos analitos em um intervalo de confiança de 95% foi obtido e está apresentado na Figura 3.

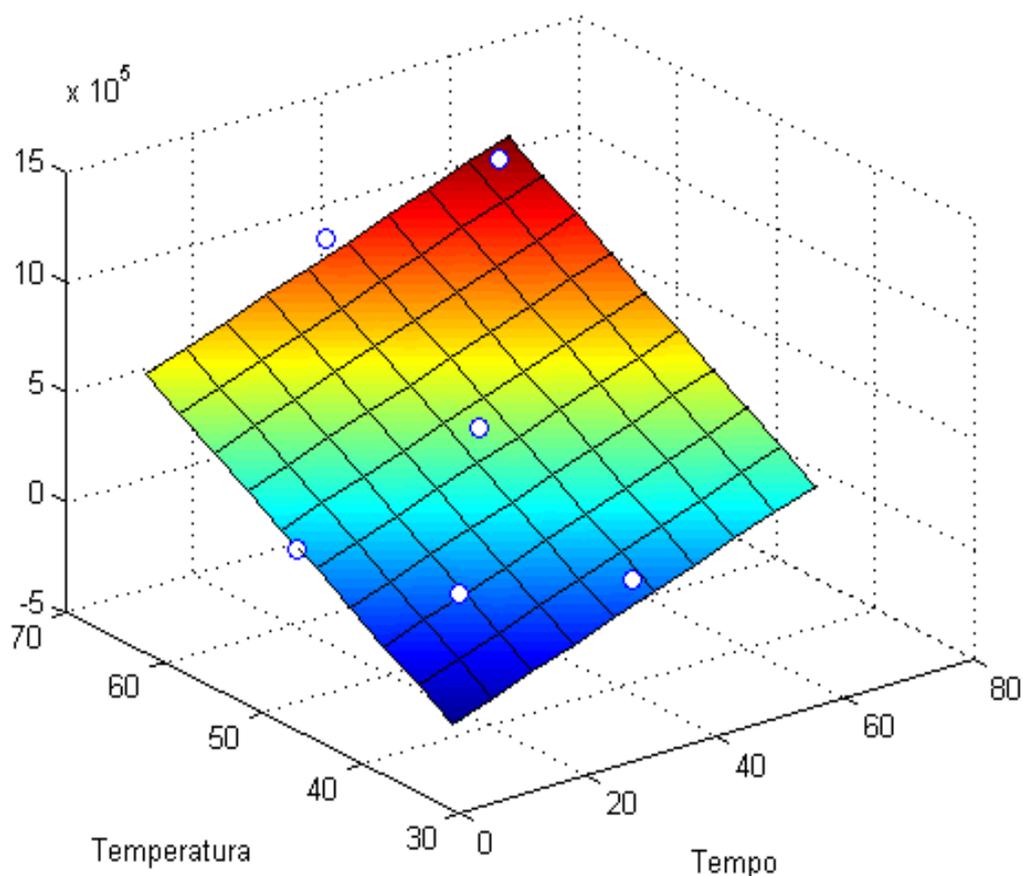
Figura 3 – Gráfico de Pareto obtido do planejamento composto central para verificar a influência dos parâmetros na extração dos analitos.



Com o gráfico de Pareto pode-se ter uma visualização clara dos efeitos dos fatores avaliados. Assim, verifica-se que o tempo e a temperatura de extração,

apresentaram efeito significativo na extração dos compostos. Além disso, é notável que a influência da temperatura se mostrou mais relevante que o efeito do tempo de extração e que a interação destes dois parâmetros não é significativa na extração. Um gráfico de superfície de resposta com as variáveis tempo e temperatura está ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Superfície de resposta para o planejamento experimental.



Observando o gráfico de superfície de resposta é possível constatar que os aumentos da temperatura e do tempo de extração resultam em um aumento na média geométrica das áreas dos picos, sendo as maiores médias ilustradas na região em vermelho na superfície. O formato da superfície resposta ilustrada na Figura 4 indica que para maiores tempos e temperaturas de extração a média geométrica das respostas tendem a serem maiores. Diante disso, deveria ser realizada uma otimização envolvendo temperatura maiores que 70 °C e tempo de extração maiores que 68,2 min, a fim de se obter uma região de máxima extração. Entretanto, extrações que demandassem mais que 40 minutos poderiam se tornar inviáveis pelo excesso de tempo requerido para as

análises. Já a elevação da temperatura a mais de 70 °C, possivelmente, resultaria na maior volatilização de etanol e de água, bem como na condensação desses na superfície da fibra de SPME, o que poderia diminuir a sensibilidade da fibra para extração dos ftalatos e causar variações nas extrações. Além disso, com base nos fundamentos da SPME, existem dois equilíbrios governantes, entre a fase gasosa e a matriz e entre a fase gasosa e o revestimento da fibra. O aumento da temperatura pode ser responsável por uma diminuição indesejada da constante de equilíbrio da fase sorvente/amostra, uma vez que a absorção do analito pelo revestimento geralmente é um processo exotérmico.

Sendo assim, optou-se por utilizar as condições determinadas de 40 min e 70 °C, uma vez que essas possibilitaram a obtenção de áreas satisfatórias para os picos dos ftalatos avaliados, garantido, assim, a extração de quantidades suficientes dos analitos em tempo aceitável de análise.

3.2 Validação

Com o objetivo de validar o método otimizado foram avaliados alguns parâmetros de mérito tais como linearidade, LOD, LOQ, precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão (testes de recuperação). Foi construída uma curva analítica a partir de extrações em triplicata, utilizando soluções padrão contendo DMP, DEP, DiBP, DBP e DEHP, em seis níveis diferentes de concentração, apresentados na Tabela 1.

A partir da curva analítica observou-se que todos os analitos apresentam linearidade com coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,99 em todo intervalo avaliado. A partir da inclinação da curva de calibração e do desvio padrão do intercepto de cada analito calculou-se o LOD e o LOQ. Os resultados obtidos para cada analito estão apresentados na Tabela 43.

Tabela 3 – Figuras de mérito para a validação do método HS-SPME-GC- MS para a quantificação de ftalatos (n=3).

Analito	Faixa µg L⁻¹	Equação da reta	R²	LOD µg L⁻¹	LOQ µg L⁻¹
DMP	15,30 – 204,00	$y = 372,80x + 1264,30$	0,9956	12,54	37,99
DEP	15,00 – 200,00	$y = 1207,66x + 12752,00$	0,9988	6,31	19,12
DiBP	11,60 – 116,00	$y = 6124,75x + 71967,90$	0,9948	8,04	24,36
DBP	11,80 – 188,80	$y = 3394,80x + 17570,75$	0,9978	6,93	20,99
DEHP	18,80 – 250,00	$y = 1668,84x + 12955,62$	0,9959	14,83	44,95

A repetibilidade e a precisão intermediária foram determinadas para avaliar a precisão do método, empregando a injeção de soluções padrão, e o teste de recuperação foi utilizado para avaliar a exatidão do método, empregando uma amostra enriquecida com os analitos. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4. Os CV foram determinados em níveis de concentração baixo, médio e alto, sendo observado valores para a repetibilidade variando de 6,3% a 15,9% e para a precisão intermediária variando de 5,6% a 16,6%, o que indica uma precisão adequada e satisfatória para as amostras analisadas. Já a recuperação variou entre 88% e 112%, indicando a exatidão do método desenvolvido. Os valores de precisão e exatidão obtidos nessa metodologia estão similares aos obtidos por Ye *et al*, (2009) na determinação de oito ftalatos em cerveja pilsen comercial, obtendo precisão variando de 1,69% a 13,51% e recuperações entre 86,3% e 109,3%.

Tabela 4 – Resultados da validação da precisão e recuperação. (N = 3).

	Repetibilidade			Precisão Intermediária			Recuperação	
	CV (%)			CV (%)			(%)	
	Baixa	Média	Alta	Baixa	Média	Alta	Média	Alta
DMP	7,9	15,9	7,0	15,2	8,5	11,8	112	102
DEP	6,0	11,2	9,5	15,5	5,6	15,8	110	103
DiBP	7,5	7,6	12,8	14,0	11,4	11,7	92	97
DBP	6,3	6,3	9,5	16,6	13,5	14,2	88	101
DEHP	11,2	13,4	10,1	9,1	8,2	10,7	98	106

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3 e na Tabela 4, o método proposto para determinação simultânea de DMP, DEP, DiBP, DBP e DEHP em amostras de cerveja mostra-se adequado e apresenta boa aplicabilidade.

3.3 Amostras

Após a validação, o método foi aplicado para análise de 33 cervejas de estilos diferentes, sendo elas fabricadas por cervejeiros caseiros (1 até 11) e por cervejarias industriais (12 até 33), os resultados estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 5 – Concentrações de DMP, DEP, DiBP, DBP e DEHP em cervejas caseiras e industriais, envasadas em plástico, vidro e lata (em $\mu\text{g L}^{-1}$).

Amostra	Analitos					Envase
	DMP	DEP	DiBP	DBP	DEHP	P/V/L*
1	-	-	125,70	-	182,11	V
2	-	-	25,95	-	-	V
3	< LOQ	-	< LOQ	-	-	V
4	-	-	37,97	-	-	V
5	-	-	< LOQ	-	-	V
6	-	-	45,08	-	-	V
7	-	-	< LOQ	-	< LOQ	V
8	-	-	-	-	-	V
9	-	-	-	-	< LOQ	V
10	-	-	-	-	-	V
11	-	-	32,37	-	97,60	P
12	< LOQ	-	-	-	80,47	P
13	-	-	41,30	-	-	P
14	-	-	-	-	-	P
15	-	-	-	-	-	P
16	-	-	-	-	-	P
17	-	-	-	-	-	P
18	-	< LOQ	-	-	120,80	P
19	-	< LOQ	-	-	97,14	P
20	-	-	-	-	-	P
21	-	-	-	-	-	V
22	-	-	-	-	-	V
23	-	-	-	-	75,29	V
24	-	-	-	-	-	V
25	-	-	-	-	< LOQ	V
26	-	-	-	-	< LOQ	V
27	-	-	-	-	-	L
28	-	-	-	-	-	L
29	-	-	-	-	-	L

30	-	-	-	-	-	L
31	-	-	-	-	-	L
32	-	-	-	-	-	L
33	-	-	-	-	-	L

* Plástico (P), Vidro (V), Lata (L)

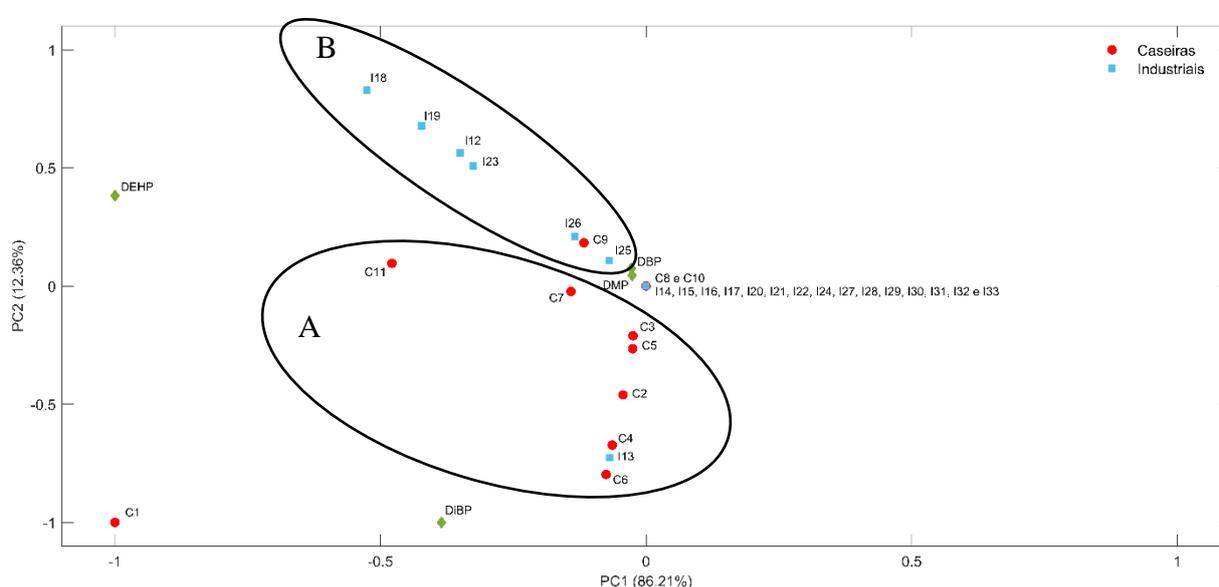
Em 16 das 33 cervejas analisadas foi detectada a presença de pelo menos um dos ftalatos, sendo realizada a quantificação de ftalatos em 11 amostras, enquanto que em 5 amostras a concentração foi observada entre o LOD e o LOQ para os analitos. Como pode ser visto, DiBP e DEHP, foram os principais ftalatos encontrados nas cervejas, com concentrações variando de 25,95 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 125,70 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 75,29 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 182,11 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, sendo os valores mais elevados encontrados em amostras caseiras. Os ftalatos DMP e DEP foram detectados em apenas quatro amostras em concentração acima do LOD, porém abaixo do LOQ, não sendo possível afirmar a concentração presente dos mesmos. Já o DBP não foi detectado em nenhuma amostra. Ao comparar a presença dos ftalatos em função da produção caseira ou industrial, observou-se que em 81% das 11 amostras produzidas por cervejeiros caseiros foi possível detectar a presença de ftalatos acima do LOD, enquanto que apenas 31% das 22 cervejas industriais analisadas continham um dos ftalatos acima do LOD.

As concentrações encontradas para o DEHP e o DiBP em algumas amostras são maiores que aquelas encontradas por Ye *et al.* (2009) e por Carnol *et al.* (2016). Ye *et al.* (2009) desenvolveram uma metodologia baseada no uso do HS-SPME-GC-MS para determinar ftalatos em cervejas comerciais usando uma fibra desenvolvida em laboratório revestida com benzoxi-C[6]/OH-TSO, quantificando DEHP nas amostras com concentrações de até 5,24 $\mu\text{g L}^{-1}$. Carnol *et al.* (2017), avaliaram a presença de ftalatos em cervejas por HS-SPME-GC-MS, encontrando contaminação em todas as cervejas avaliadas e sendo o DEHP o mais encontrado. Concentrações de até 1,74 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram encontradas para o DEHP; de 37,14 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o DBP; de 2,21 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o dioctilftalato (DOP) e o benzil butil ftalato (BBP) e de até 23,80 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o DEP. Entretanto, nesses trabalhos foram analisadas apenas cervejas industriais.

Os dados apresentados na Tabela 5 foram usados para realizar uma PCA, usando os valores das concentrações de ftalatos encontrados nas amostras, a fim de determinar semelhanças entre as mesmas. As amostras nas quais as concentrações encontravam-se abaixo do valor de LOD determinado para cada ftalato não foram consideradas na

análise de PCA. As concentrações de ftalatos presentes nas amostras de cerveja foram dispostas em uma matriz 33 x 5, na qual as amostras foram dispostas nas linhas ($n = 33$) e os analitos nas colunas ($n = 5$). A matriz foi processada pelo método PCA sem nenhum pré-processamento e o resultado está apresentado como gráfico *biplot* na Figura 5, no qual as amostras de cervejas caseiras estão apresentadas em vermelho, as amostras industriais em azul e as variáveis em verde. As PC1 e PC2 explicam 85,78% e 12,05% da variância dos dados, respectivamente, bem como a influência das variáveis.

Figura 5 – Gráfico *biplot* das cervejas caseiras (vermelho) e cervejas industriais (azul).



Embora não exista um agrupamento visível entre as amostras baseados em função do tipo de produção ou do tipo de envase, pode-se observar algumas tendências na Figura 4. No Grupo A encontram-se a maioria das cervejas caseiras nas quais foram detectados ftalatos, (amostra 1 apresenta muita diferença e a amostra 9 ficou agrupada no Grupo B), enquanto que no Grupo B encontram-se a maioria das cervejas produzidas industrialmente (grandes e micro cervejarias) nas quais foram detectados ftalatos, com exceção da amostra 13 que encontra-se no grupo A. Todas as 17 amostras nas quais não foi detectado nenhum ftalato encontram-se sobrepostas no centro do gráfico, contendo 2 amostras caseiras e 15 amostras industriais.

Todas cervejas analisadas também foram avaliadas quanto ao material de envase, pois nessa etapa também pode ser utilizado plástico, que pode ser fonte de contaminação de ftalatos. Nas tampas das garrafas de vidros há um plástico na parte

interna, utilizado como um vedante para manter a integridade e as propriedades da cerveja. Já nas latas, há uma película interna de um material polimérico para evitar o contato da cerveja diretamente com o alumínio. Além do envase em garrafas de vidro e em latas, recentemente algumas microcervejarias tem usado garrafas plásticas para envasar a cerveja, que já são vendidas em supermercados e postos de venda de cervejas especiais. Em complemento, algumas microcervejarias e postos de distribuição de cerveja e chope em barril utilizam essas garrafas plásticas (ou *growlers*) para envase, os quais podem ser “recarregados” pelo sistema de torneiras (*on tap*).

Neste trabalho, dentre as amostras analisadas, algumas foram adquiridas comercialmente, as quais foram produzidas por indústrias, e outras foram doadas por cervejeiros caseiros. Industrialmente as cervejas são produzidas utilizando materiais de inox, enquanto que nos processos realizados por cervejeiros caseiros, além dos materiais de inox e alumínio, comumente são utilizados materiais plásticos por serem muito mais baratos, os quais que podem ser fontes de contaminação para as amostras produzidas por cervejeiros caseiros. A fim de identificar se houve o uso de materiais plásticos na produção das cervejas caseiras analisadas, foi disponibilizado virtualmente um questionário relacionado com o processo e as condições de produção, o qual foi respondido por todos os cervejeiros e as respostas encontram-se como material suplementar.

Assim, em vez de analisar o gráfico da PCA apenas como cervejas caseiras e industriais, ou como amostras envasadas em plástico ou envasada em outros recipientes, a separação entre as cervejas visualizada na PCA da Figura 5 pode ser justificada pelos materiais utilizados nas etapas de produção. No Grupo A em alguma etapa da produção foi utilizado plástico e no Grupo B o material inox foi prevalecente em toda a produção, mas as amostras foram envasadas em latas, garrafas de plástico ou de vidro. As amostras enquadradas na parte superior à esquerda (Grupo B), são aquelas regidas pela presença de DEHP, já as amostras dispostas na parte inferior à esquerda (Grupo A), são regidas pela presença de DiBP. Já a presença de DMP e o DEP praticamente não tem peso nessa PCA e as amostras encontram-se próximo do zero em PC1 e PC2, juntamente com as 17 amostras que não apresentaram ftalatos, dentre as quais há amostras caseiras e industriais, e envasadas em plástico, vidro ou lata. Em complemento, observou-se que em todas as amostras envasadas em lata não houve presença de nenhum ftalato.

Ao observar individualmente as amostras com altas concentrações de ftalatos, a amostra 1 apresentou a maior concentração para DIBP e para DEHP e, por isso, avaliou-se o formulário respondido pelos cervejeiros caseiros em busca de uma diferença que poderia justificar tal comportamento. De acordo com as respostas, a amostra 1 esteve em contato com material plástico de grau não alimentício na torneira do balde utilizado na fermentação, no balde usado para trasfega (para realizar a carbonatação por *primming*) e nas mangueiras de conexão (PVC atóxico). Outra amostra com elevada concentração de DIBP e DEHP é a amostra 11, que esteve em contato com plástico não alimentício na torneira do fermentador e no sistema de carbonatação, denominado de “Agrokeg”. Esse sistema de carbonatação usado por alguns cervejeiros caseiros emprega um pulverizador agrícola manual, similar aquele apresentado no material suplementar S3, é confeccionado, em sua maioria, em polipropileno e em teoria não teria ftalatos em sua composição. Entretanto, nos sites dos fabricantes não foi possível identificar a composição dos demais partes do sistema, como anéis de vedação, tubos e outras conexões, que poderiam ser fonte de ftalatos. Além disso, podem ser encontrados alguns vídeos na internet (links disponibilizados no material suplementar S4) explicando como montar um “Agrokeg” a partir de um pulverizador agrícola para carbonatar a cerveja em casa, sendo que alguns vídeos indicam não utilizar resina epóxi para colar vazamentos. Entretanto, não há a informação do material específico do “Agrokeg” empregado na carbonatação da amostra 11.

Apesar da utilização de plástico de grau não alimentício durante a produção (torneiras) da amostra 11 assim como na amostra 1 (fermentador), observa-se uma diferença evidente da presença de ftalatos em ambas, o que sugere que a diferença de concentração pode ser proveniente do tempo de exposição da amostra ao material plástico em uso ou que o contato da amostra com plástico da torneira não é a única fonte de contaminação de cervejas por ftalatos. O fato de não ter sido detectado nenhum ftalato nas amostras caseiras 8 e 10 pode ser justificado por menor contato da cerveja a materiais plásticos durante a produção, conforme as respostas do formulário, ou do uso de plásticos que não contenham ftalatos.

Avaliando o uso ou a presença de materiais plásticos durante a produção das cervejas avaliadas, observa-se que 81% das cervejas, de alguma forma estiveram em contato com materiais plásticos, seja durante a produção ou no envase, sendo a possível fonte dos ftalatos quantificados nas cervejas avaliadas. Além disso, muitos cervejeiros

caseiros utilizam anéis de vedação de diversos materiais para minimizar vazamentos ao longo do processo à quente, podendo também ser fonte de contaminação.

Dos entrevistados, 59% utilizam bomba de recirculação com partes em inox e partes em plástico, cuja composição plástica geralmente não é informada pelo fabricante. Como citado anteriormente, as matérias primas utilizadas também podem ser fonte de contaminação, uma vez que os ftalatos são onipresentes e podem ser encontrados no ar, no solo e na água, especificamente foram encontrados em águas residuais, superficiais, da chuva e até mesmo em água potável (ERYTHROPEL *et al.*, 2014). Vale ressaltar que cervejeiros caseiros utilizam água mineral acondicionada em galões de plástico ou água filtrada, todas elas em contato com material plástico, que embora não seja PVC, pode ser fonte de contaminação. Além disso, os tipos de materiais e as condições de armazenagem das matérias primas utilizadas também são fontes de contaminação.

Dessa forma, embora seja difícil especificar a origem exata dos ftalatos, pode-se afirmar que as cervejas caseiras que empregam material plástico de origem desconhecida ao longo do processo de fabricação da cerveja apresentaram maiores concentrações de DiBP e DEHP. Sendo aconselhável o uso de material plástico de grau alimentício.

4 Conclusões

O desenvolvimento de uma metodologia baseada em HS-SPME-GC-MS para a determinação de DMP, DEP, DiBP, DBP e DEHP em cervejas caseiras e industriais foi otimizado e validado. A fibra PDMS/DVB provou ser adequada para a extração simultânea de todos os ftalatos investigados e foi utilizada para a otimização multivariada avaliando o tempo e temperatura de extração. Foi observado que altas temperaturas e maior tempo favorecem a extração. A validação realizada evidenciou a confiabilidade do método confirmando a linearidade, precisão e exatidão do método, mostrando-se adequado para tal objetivo.

A avaliação das cervejas caseiras e industriais evidenciou que a contaminação por ftalato é um problema generalizado, pois a contaminação foi encontrada em 48% das cervejas analisadas, sendo presente em quase todas as cervejas caseiras em concentrações acima do LOD. Além disso, as concentrações medidas neste estudo indicam que o processo de fabricação é uma das principais fontes de contaminação por

ftalato na cerveja, no entanto, as origens exatas dos ftalatos são difíceis de determinar e podem ser um tema interessante para estudos futuros.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de estudo de A. A. Gonçalves, A. C. Paiva e L. F. Pereira. À Fundação de Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo suporte financeiro. À Central de Análises e Prospecção Química (CAPQ) da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e o LC-GC do Instituto de Química, no Departamento de Química Analítica da Universidade Estadual de Campinas (IQ-UNICAMP) pela cessão das instalações e equipamentos para a realização deste trabalho.

5 Referências Bibliográficas

BRATU, M. M., BIRGHILA, S., POPESCU, A., *et al.* **Influence of Packaging Material on Polyphenol Content and Antioxidant Activity in Some Commercial Beers. Processes** . [S.l.: s.n.]. , 2021

CAO, X.-L. Phthalate Esters in Foods: Sources, Occurrence, and Analytical Methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 1, p. 21–43, 2010.

CARNOL, L.; SCHUMMER, C.; MORIS, G. Quantification of Six Phthalates and One Adipate in Luxembourgish Beer Using HS-SPME-GC/MS. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 2, p. 298–309, 2017.

COUSINS, I.; MACKAY, D. Correlating the physical–chemical properties of phthalate esters using the ‘three solubility’ approach. **Chemosphere**, v. 41, n. 9, p. 1389–1399, 2000.

ERDEM, P.; ALTINIŞIK TAĞAÇ, A.; TASHAKKORI, P. *et al.* Biopolymer-imidazolium based dicationic ionic liquid modified clay bionanocomposite coating for solid-phase microextraction of phthalate esters. **Microchemical Journal**, v. 170, p. 106648, 2021.

ERYTHROPEL, H. C.; MARIC, M.; NICELL, J. A. *et al.* Leaching of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 24, p. 9967–9981, 2014.

FARAJZADEH, M. A.; SOROURADDIN, S. M.; AFSHAR MOGADDAM, M. R. Microextraction methods for the determination of phthalate esters in liquid samples: A review. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 14, p. 2470–2487, 2015.

FENG, Y.-L.; ZHU, J. SENSENSTEIN, R. Development of a headspace solid-phase

microextraction method combined with gas chromatography mass spectrometry for the determination of phthalate esters in cow milk. **Analytica Chimica Acta**, v. 538, n. 1, p. 41–48, 2005.

HE, N. X.; BAYEN, S. An overview of chemical contaminants and other undesirable chemicals in alcoholic beverages and strategies for analysis. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 6, p. 3916–3950, 2020.

HOLADOVÁ, K.; PROKŮPKOVÁ, G.; HAJŠLOVÁ, J. *et al.* Headspace solid-phase microextraction of phthalic acid esters from vegetable oil employing solvent based matrix modification. **Analytica Chimica Acta**, v. 582, n. 1, p. 24–33, 2007.

HUANG, L.; ZHU, X.; ZHOU, S. *et al.* Phthalic Acid Esters: Natural Sources and Biological Activities. **Toxins**, v. 13, n. 7, p. 495, 2021.

JAGIRANI, M. S.; SOYLAK, M. Review: Microextraction Technique Based New Trends in Food Analysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, p. 1–32, 2020.

LI, J., SU, Q.; LI, K.-Y. *et al.* Rapid analysis of phthalates in beverage and alcoholic samples by multi-walled carbon nanotubes/silica reinforced hollow fibre-solid phase microextraction. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3714–3720, 2013.

LUKS-BETLEJ, K., POPP, P., JANOSZKA, B., *et al.* "Solid-phase microextraction of phthalates from water", **Journal of Chromatography A**, v. 938, n. 1, p. 93–101, 2001.

PANG, Y.-H.; YUE, Q.; HUANG, Y. *et al.* Facile magnetization of covalent organic framework for solid-phase extraction of 15 phthalate esters in beverage samples. **Talanta**, v. 206, p. 120194, 2020.

PARREIRA, F. V.; CARDEAL; Z. de L. Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 646–654, 2005.

PERESTRELO, R.; SILVA, C. L.; ALGARRA, M. *et al.* Monitoring Phthalates in Table and Fortified Wines by Headspace Solid-Phase Microextraction Combined with Gas Chromatography–Mass Spectrometry Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 31, p. 8431–8437, 2020.

PIZARRO, C., PÉREZ-DEL-NOTARIO, N., GONZÁLEZ-SÁIZ, J. M. "Optimisation of a simple and reliable method based on headspace solid-phase microextraction for the determination of volatile phenols in beer. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 39, p. 6013–6021, 2010.

RUSSO, M. V., NOTARDONATO, I., AVINO, P., *et al.* "Determination of phthalate esters at trace levels in light alcoholic drinks and soft drinks by XAD-2 adsorbent and gas chromatography coupled with ion trap-mass spectrometry detection". **Analytical Methods**, v. 6, n. 17, p. 7030–7037, 2014.

SAJID, M.; BASHEER, C.; ALSHARAA, A. *et al.* Development of natural sorbent based micro-solid-phase extraction for determination of phthalate esters in milk

samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 924, p. 35–44, 2016.

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

YE, C.-W.; GAO, J.; YANG, C. *et al.* Development and application of an SPME/GC method for the determination of trace phthalates in beer using a calix[6]arene fiber, **Analytica Chimica Acta**. v. 641, n. 1–2, p. 64–74, 2009.

Materiais suplementares

Formulário S1 - Formulário referente à fabricação das cervejas caseiras

Investigação da presença de plastificantes em cerveja

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa de forma totalmente voluntária.

O objetivo desse estudo é avaliar a presença de possíveis compostos contaminantes na cerveja. Dentre esses compostos, os ftalatos, os quais são liberados por migração de materiais plásticos utilizados em alguma etapa da produção da bebida e que podem causar riscos à saúde, o que justifica essa pesquisa. O foco, em especial, são os cervejeiros caseiros, visto que muitos desses utilizam materiais plásticos em diversas etapas da produção e/ou envase. Como contrapartida, você será informado, individualmente, dos níveis de contaminação desses plastificantes em sua cerveja ao final do estudo.

Antes de concordar com a pesquisa, é importante que você compreenda que será necessário doar uma amostra de uma de suas cervejas produzidas, envasadas da forma habitual. O recipiente no qual a cerveja foi envasada não será devolvido.

Será garantida, durante todas as fases da pesquisa: sigilo, privacidade, e acesso aos resultados.

Estilo de cerveja _____

1. Qual o recipiente utilizado para o envase da cerveja?

- a) Lata de alumínio
- b) Garrafa de vidro
- c) Growler plástico
- d) Growler vidro/cerâmica
- e) Agrokeg
- f) Outro: _____

2. Quais os materiais das mangueiras utilizadas nas etapas de produção da cerveja (brasagem, recirculação, fervura, fermentação, envase, etc)?
 - a) Cloreto de polivinil - PVC
 - b) Nylon
 - c) Silicone
 - d) Polietileno
 - e) Outro. Qual?

3. Os materiais plásticos utilizados durante a produção de sua cerveja são de grau alimentício?
 - a) Sim b) Não c) Não sei

4. Qual o material do fermentador utilizado?
 - a) Inox
 - b) Balde de plástico alimentício
 - c) Balde de plástico não alimentício
 - d) Balde de plástico alimentício reutilizado (margarina, água, sorvete, etc)
 - e) Balde de plástico não alimentício reutilizado
 - f) Outros. Qual?

5. Quais os materiais dos conectores utilizados na produção?
 - a) Inox
 - b) Liga metálica
 - c) Plástico
 - d) Outro. Qual?

6. Em caso de uso de material plástico, este é de grau alimentício?
 - a) Sim b) Não c) Não sei

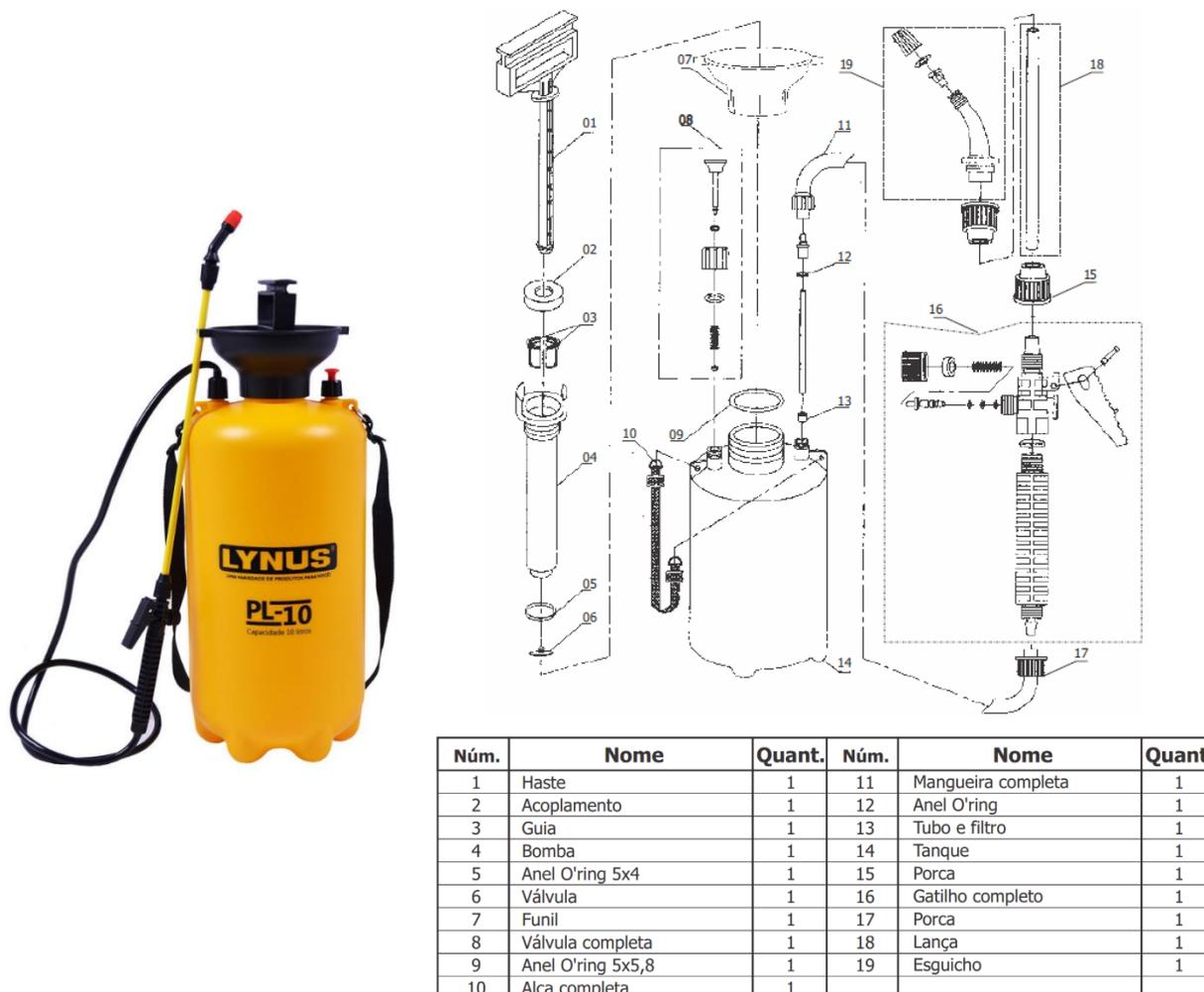
7. Qual o material das torneiras utilizadas na produção?
 - a) Metálico
 - b) Plástico
 - c) Plástico não alimentício
 - d) Outro. Qual?

- 8.** Caso use bomba para recirculação ou outras etapas, qual o tipo de Bomba utilizada?
- a) Inox (Chugger ou similar)
 - b) Cabeça de Inox (maioria da china – tipo MP15R)
 - c) Cabeça de plástico (MP15R)
 - d) Bomba de máquina de lavar ou similares (em plástico não alimentício)
 - e) Outro. Qual?
- 9.** Caso faça trasfega para maturação em outro recipiente, qual o material do recipiente?
- a) Inox
 - b) Balde de plástico alimentício
 - c) Balde de plástico não alimentício
 - d) Não realizo trasfega
 - e) Outro
- 10.** Qual o material utilizado para a carbonatação (kegs)?
- a) Metálico
 - b) Plástico
 - c) Gambiarras (como regador plástico, pulverizados, etc)
 - d) Agrokeg
 - e) Vidro
 - f) Outro
- 11.** O material utilizado para carbonatação é:
- a) Novo
 - b) Reutilizado
- 12.** Houve utilização de plástico durante a produção da cerveja, além dos citados anteriormente? Especificar.

Tabela S2 – Respostas dos cervejeiros caseiros quanto à fabricação das amostras analisadas, de acordo com o Formulário S1

Amostras	Perguntas do Formulário S1									
	1	2	3	4	5	7	8	9	10	11
1	b	a,b,c	b	c	b	c	a	b	e	b
2	c	c	a	b	a	a	c	d	b	b
3	f (post mix inox)	c	a	a	a	a	b	d	e	b
4	c	e (não usa)	a	d	b	d (água)	e (não usa)	b	d	b
5	b	b	a	b	a	a	a	d	a	a
6	b	c e d	a	f (polipropileno)	a	a	a	d	b	b
7	b	e (pvc atóxica)	a	b	a	b	a	d	e	b
8	b	c	a	b	a	a	b	d	a	a
9	b	c	a	d	a	b	c	d	b	b
10	b	c	a	b	a	a	b	b	a	b
11	b	e (pvc atóxica)	a	f (polipropileno)	a	c	b	d	f (inox)	a

Figura S3 – Imagem do equipamento Agrokeg.



Fonte: <https://lynus.com.br/produto/pl-10-pulverizador-manual>

Referências S4 – Uso do “Agrokeg” para carbonatação de cerveja caseira

GUEDES, Luis. Adaptação simples e barata para tampa do Agrokeg Lynus. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=hpCUfuQ3FZs>>. Acesso em: 20 nov. 2021.

AGROKEG – Cosplay de PostMix!. Mosturando. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=jyKivj4f39k>>. Acesso em: 20 nov. 2021.

MAURICIO, Christopher Nicolas. Agrokeg 5l parte 2. Disponível em: <https://www.youtube.com/watch?v=2dZF7YLQ_Dw>. Acesso em: 20 nov. 2021.

FINALMENTE: tampa para o Agrokeg!. Cerveja Fácil. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=6jkFA-aHrdY>>. Acesso em: 20 nov. 2021.