

CENTRO UNIVERSITÁRIO SENAI CIMATEC
Programa de Pós-Graduação em Gestão e Tecnologia Industrial

MARINICE SANTIAGO DOS SANTOS ACÁCIO

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
CARBONÍLICOS LIVRES E LIGADOS EM CERVEJAS
ARTESANAIS**

Salvador

2022

MARINICE SANTIAGO DOS SANTOS ACÁCIO

**IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS
CARBONÍLICOS LIVRES E LIGADOS EM CERVEJAS
ARTESANAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gestão e Tecnologia Industrial do Centro Universitário SENAI CIMATEC como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Gestão e Tecnologia Industrial.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Bruna Aparecida Souza Machado.

Coorientador: Prof. Dr. Jeancarlo Pereira dos Anjos.

Salvador

2022

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro Universitário SENAI CIMATEC

A168i Acácio, Marinice Santiago dos Santos

Identificação e quantificação de compostos carbonílicos livres e ligados em cervejas artesanais / Marinice Santiago dos Santos Acácio. – Salvador, 2022.

77 f. : il. color.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Bruna Aparecida Souza Machado.

Coorientador: Prof. Dr. Jeancarlo Pereira dos Anjos.

Dissertação (Mestrado em Gestão e Tecnologia Industrial) – Programa de Pós-Graduação, Centro Universitário SENAI CIMATEC, Salvador, 2022.

Inclui referências.

1. Cerveja artesanal. 2. Compostos carbonílicos. 3. Métodos cromatográficos. 4. Derivatização. I. Centro Universitário SENAI CIMATEC. II. Machado, Bruna Aparecida Souza. III. Anjos, Jeancarlo Pereira dos. IV. Título.

CDD 663.1

MARINICE SANTIAGO DOS SANTOS ACÁCIO

IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS LIVRES E LIGADOS EM CERVEJAS ARTESANAIS

A Banca Examinadora, constituída pelos professores abaixo listados, aprova a Defesa de Mestrado, intitulada "IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS LIVRES E LIGADOS EM CERVEJAS ARTESANAIS" apresentada no dia 04 de abril de 2022, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Gestão e Tecnologia Industrial.

Orientadora:

DocuSigned by:
Bruna Machado
C43B08E7447F4F2
Prof.^a Dr.^a Bruna Aparecida Souza Machado
SENAI CIMATEC

Coorientador:

DocuSigned by:
Jeancarolo Pereira dos Anjos
2FCE3A388E11487
Prof. Dr. Jeancarolo Pereira dos Anjos
SENAI CIMATEC

Membro Externo:

DocuSigned by:
Gisele Rocha
CB00327088484E7
Profa. Dra. Gisele Olimpio da Rocha
UFBA

Membro Externo:

DocuSigned by:
Anibal de Freitas Santos Junior
4494152912404
Prof. Dr. Anibal de Freitas Santos Junior
UNEB

*Dedico este trabalho ao meu esposo, Ubiratan,
e à minha filha, Amanda. Meus parceiros
incondicionais em todos os momentos.
Obrigada pelo incentivo, pelo amor e pelo
carinho.*

.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser a minha força e me sustentar nos momentos difíceis e de angústia.

A meu esposo Ubiratan e a minha filha Amanda, pelo incentivo sempre, pela compreensão, por terem sido meu braço forte e por não me deixar desistir. Amo vocês.

A minha irmã Edna por sempre me incentivar e pelo apoio de sempre na leitura do meu trabalho. Você é especial.

A minha sobrinha Juliana pelo incentivo mesmo de longe.

A professora Bruna por ter aceitado me orientar neste projeto.

Ao Professor Jeancarlo, pela orientação e parceria em todo o tempo. Seus ensinamentos foram de muita importância na realização deste trabalho. Levarei para a vida tudo o que eu aprendi com você.

As colegas do LIPAQ, Eliete e Tamires. Obrigada pelo apoio e parceria.

A Sandra e Wellington, obrigada pela amizade, incentivo e parceria de sempre. Da faculdade para a vida sempre.

Ao Centro Universitário CIMATEC, pela oportunidade e incentivo na realização deste projeto.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

RESUMO

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas no mundo, sendo o Brasil o terceiro maior produtor. A composição da cerveja, assim como seu processo de produção, leva à formação de compostos químicos que podem alterar o sabor e a estabilidade do produto final, a exemplo dos compostos carbonílicos. A presença destes na bebida pode ainda causar danos à saúde humana. Este trabalho teve como objetivo identificar e quantificar compostos carbonílicos livres e ligados em amostras reais de cervejas artesanais. As amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Salvador - Bahia e submetidas à análise de 15 compostos carbonílicos (formaldeído, acetaldeído, acroleína, propionaldeído, crotonaldeído, metacroleína, butiraldeído, benzaldeído, valeraldeído, ciclohexanona, hexaldeído, heptanal, octanal, nonanal e decanal), por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método foi validado por meio da avaliação da seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e precisão. Para análise dos compostos carbonílicos livres, foi realizada a reação de derivatização em 50 mL da amostra previamente descarbonatada, adicionou-se ácido clorídrico concentrado (até $\text{pH} < 2$) e 10 mL do agente derivatizante (2,4-dinitrofenilidrazina) a 0,5%. A amostra foi colocada no ultrassom (20 min) para completar a reação. Após a derivatização, cada amostra foi concentrada por meio de extração em fase sólida (SPE) usando cartucho C18. Os analitos retidos no cartucho foram eluídos com acetonitrila (1,0 mL) e injetados no cromatógrafo. Para a análise dos compostos carbonílicos ligados, em 50 mL da amostra adicionou-se hidróxido de sódio 1 N para ajuste do $\text{pH} \approx 11$ e agitou-se por 30 min. Após agitação, a amostra foi derivatizada conforme o procedimento adotado para a análise dos compostos carbonílicos livres. As análises foram realizadas por cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (HLPC-DAD). O método apresentou boa linearidade ($R^2 \geq 0,9990$). Os limites de detecção variaram de 1,69 (octanal) a 6,13 $\mu\text{g L}^{-1}$ (metacroleína), enquanto que para os limites de quantificação a variação foi entre 5,62 (octanal) e 20,45 $\mu\text{g L}^{-1}$ (metacroleína). A repetibilidade e a precisão intermediária mostraram-se satisfatórias, com desvios padrão relativos inferiores a 16,9% (metacroleína) e 16,9% (hexaldeído), respectivamente. Nas amostras analisadas, as concentrações encontradas para os compostos carbonílicos livres variaram de 7,30 $\mu\text{g L}^{-1}$ (acroleína) a 2896,97 $\mu\text{g L}^{-1}$ (acroleína). Para os compostos carbonílicos ligados, a variação foi entre 11,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (octanal) e 2270,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ (propionaldeído). O método proposto apresentou resultados satisfatórios que demonstraram a capacidade para identificar e quantificar compostos carbonílicos livres e ligados, em diferentes concentrações, em cervejas artesanais.

Palavras-chave: cerveja artesanal; compostos carbonílicos; métodos cromatográficos; derivatização.

ABSTRACT

Identification and quantification of free and bound carbonyl compounds in craft beers

Beer is one of the most consumed alcoholic beverages in the world, with Brazil being the third largest producer. The composition of beer, as well as its production process, leads to the formation of chemical compounds that can change the taste and stability of the final product, such as carbonyl compounds. The presence of these in the drink can also cause damage to human health. This work aimed to identify and quantify free and bound carbonyl compounds present in real samples of craft beers. The samples were acquired in commercial establishments in the city of Salvador - Bahia and submitted to the analysis of 15 carbonyl compounds (formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, propionaldehyde, crotonaldehyde, methacrolein, butyraldehyde, benzaldehyde, valeraldehyde, cyclohexanone, hexaldehyde, heptanal, octanal, nonanal and decanal) by high performance liquid chromatography (HPLC). The method was validated through the evaluation of selectivity, linearity, detection limit, quantification limit, precision and accuracy. To analyze the free carbonyl compounds, the derivatization reaction was carried out in 50 mL of the previously decarbonated sample, concentrated hydrochloric acid was added (up to $\text{pH} < 2$) and 10 mL of the derivatizing agent (2,4-dinitrophenylhydrazine) at 0.5%. The sample was placed under ultrasound (20 min) to complete the reaction. After derivatization, each sample was concentrated by solid phase extraction (SPE) using C18 cartridge. The analytes retained in the cartridge were eluted with acetonitrile (1.0 mL) and injected into the chromatograph. For the analysis of bonded carbonyl compounds, sodium hydroxide 1N was added to 50 mL of the sample to adjust the $\text{pH} \approx 11$ and stirred for 30 min. After stirring, the sample was derivatized according to the procedure adopted for the analysis of free carbonyl compounds. Analyzes were performed by liquid chromatography with array diode detector (HPLC-DAD). The method showed good linearity ($R^2 \geq 0.9990$). The limits of detection ranged from 1.69 (octanal) to 6.13 $\mu\text{g L}^{-1}$ (methacrolein), while for the limits of quantification, the variation was between 5.62 (octanal) and 20.45 $\mu\text{g L}^{-1}$ (methacrolein). Repeatability and intermediate precision were satisfactory, with relative standard deviations below 16.9% (methacrolein) and 16.9% (hexaldehyde), respectively. In the analyzed samples, the concentrations found for free carbonyl compounds ranged from 7.30 $\mu\text{g L}^{-1}$ (acrolein) to 2896.97 $\mu\text{g L}^{-1}$ (acrolein). For the bonded carbonyl compounds, the variation was between 11.20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (octanal) and 2270.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ (propionaldehyde). The proposed method presented satisfactory results that demonstrated the ability to identify and quantify free and bound carbonyl compounds, in different concentrations, in craft beers.

Keywords: craft beer; carbonyl compounds; chromatographic methods; derivatization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Número de registro de estabelecimento produtores de cerveja, por ano, no Brasil. .	17
Figura 2-Esquema do processo de fabricação da cerveja.....	20
Figura 3-Representação esquemática das reações químicas envolvendo a formação de CC ligados em cervejas	31
Figura 4-Esquema da reação de derivatização de compostos carbonílicos (CC).	32
Figura 5- Etapas de preparo da solução de 2,4-DNPH	40
Figura 6-Análise de Compostos carbonílicos livres – derivatização	41
Figura 7-Análise de Compostos carbonílicos ligados - derivatização	42
Figura 8- Cromatograma obtido, por HPLC-DAD, de uma mistura padrão de CC na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, no comprimento de onda de 365nm. Identificação dos picos por nº: formaldeído (1); acetaldeído (2.); acroleína (3); propionaldeído (4); crotonaldeído (5); metacroleína (6); butiraldeído (7); benzaldeído (8); valeraldeído+ciclohexanona (9); hexaldeído (10); heptanal (11); octanal (12.); nonanal (13); decanal (14).	46
Figura 9 - Cromatograma obtido por HPLC de uma amostra de uma amostra de cerveja artesanal isenta (A) e da mesma amostra como adição (B) dos padrões de CC numa concentração de $200 \mu\text{g L}^{-1}$, no comprimento de onda de 365 nm, para certificação da seletividade. Identificação dos picos por nº: formaldeído (1); acetaldeído (2.); acroleína (3); propionaldeído (4); crotonaldeído (5); metacroleína (6); butiraldeído (7); benzaldeído (8); valeraldeído+ciclohexanona (9); hexaldeído (10); heptanal (11); octanal (12.); nonanal (13); decanal (14).....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Padrões de Identidade e Qualidade para cerveja.....	26
Tabela 2-Aditivos alimentares e seus limites permitidos pela legislação brasileira, para cervejas.	27
Tabela 3-Métodos empregados para a determinação de CC em diferentes tipos de bebidas... 35	
Tabela 4-Concentração dos padrões individuais de hidrazonas dos compostos carbonílicos, em acetonitrila.	38
Tabela 5-Informações das cervejas artesanais estudadas.	40
Tabela 6 - Equação das curvas analítica, valores de (R^2) e faixa de trabalho do CC analisados.	48
Tabela 7-Limites de detecção e limites de quantificação para os compostos carbonílicos.	48
Tabela 8 – Medida das áreas dos picos e do desvio padrão relativo (RSD%) obtidos para cada composto carbonílico na precisão Intradia (repetibilidade).	49
Tabela 9 - Áreas dos picos e desvio padrão relativo (RSD%) obtidos para cada composto carbonílico na precisão Interdia (precisão intermediária).	50
Tabela 10 - Concentração de CC livres e ligados nas amostras de cervejas artesanais.	52
Tabela 10 - Concentração de CC livres e ligados nas amostras de cervejas artesanais – Continuação.....	53
Tabela 10 - Concentração de CC livres e ligados nas amostras de cervejas artesanais – Continuação.....	54

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- MAPA – Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists
- EBC – European Brewing Convention
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- HPLC – Cromatografia líquida de alta performance (do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*)
- DAD – Detector de Arranjo de Diodos
- MS – Espectrometria de Massas (do inglês, *Mass Spectrometry*)
- CG – Cromatografia gasosa
- LQ – Limite de Quantificação
- LD – Limite de Detecção
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
- RDC – Resolução de Diretoria Colegiada
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- IN – Instrução Normativa
- DNPH – Dinitrofenilidrazina
- CERVBRASIL – Associação Brasileira da Indústria da Cerveja
- SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
- ABRACERVA - Associação Brasileira da Cerveja Artesanal
- CC – Compostos carbonílicos
- IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (do inglês, *International Agency for Research on Cancer*)
- SPE – Extração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Extraction*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS	15
1.1.1	<i>Objetivo Geral</i>	15
1.1.2	<i>Objetivos Específicos</i>	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	A PRODUÇÃO DA CERVEJA.....	16
2.1.1	<i>Cerveja artesanal</i>	22
2.2	PADRÕES DE QUALIDADE PARA A CERVEJA	25
2.3	COMPOSTOS CARBONÍICOS.....	28
2.4	MÉTODOS UTILIZADOS PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS CARBONÍICOS	31
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1	REAGENTES E PADRÕES.....	37
3.2	EQUIPAMENTOS E MATERIAIS	37
3.3	SOLUÇÕES-PADRÃO DOS COMPOSTOS CARBONÍICOS	38
3.4	SOLUÇÃO DE 2,4-DINITROFENILHIDRAZINA (2,4-DNPH).....	39
3.5	OBTENÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS	40
3.6	ANÁLISE DOS COMPOSTOS CARBONÍICOS LIVRES.....	41
3.7	ANÁLISE DOS COMPOSTOS CARBONÍICOS LIGADOS.....	41
3.8	CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS	42
3.9	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	43
3.9.1	<i>Seletividade</i>	43
3.9.2	<i>Linearidade</i>	43
3.9.3	<i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i>	44
3.9.4	<i>Precisão</i>	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1	SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	46
4.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO.....	46
4.2.1	<i>Seletividade</i>	46
4.2.2	<i>Linearidade</i>	47
4.2.3	<i>Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)</i>	48
4.2.4	<i>Precisão</i>	49

4.3 ANÁLISES DOS COMPOSTOS CARBONÍLICOS LIVRES E LIGADOS EM AMOSTRAS REAIS DE CERVEJAS ARTESANAIS.....	50
5 CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56
ANEXO I-GRÁFICO DAS CURVAS ANALITICAS CONSTRUÍDAS	63
PRODUÇÃO TÉCNICA E CIENTÍFICA.....	66

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida alcóolica, cuja produção se dá a partir da fermentação de cereais. Sua fórmula original contém como ingredientes principais o malte de cevada, água potável, lúpulo e levedura, sendo que outros cereais, classificados como adjuntos cervejeiros, podem ser acrescentados na formulação substituindo parte do malte de cevada em até 45%, em massa. Em alguns tipos de cervejas, a exemplo das artesanais, ingredientes tais como frutas, sucos de frutas, condimentos e outros, podem ser adicionados à bebida, desde que, não alterem a composição original da mesma (BRASIL,2019).

Difundida entre os povos desde a Idade Média, a cerveja é uma das bebidas mais consumidas no mundo atualmente. Inovações como refrigeração artificial, métodos de pasteurização, melhoria no cultivo de grãos de cevada, diversidades de espécies de lúpulo e leveduras, são alguns dos fatores que possibilitaram o avanço do processo produtivo da cerveja, de maneira que a mesma acompanhou a vida humana e, hoje se encontra presente em todos os continentes. Segundo a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVEBRASIL), o Brasil, com uma produção anual em torno de 14 bilhões de litros, é o terceiro maior produtor da bebida. Ainda, de acordo com a entidade o setor cervejeiro é considerado um dos que mais empregam e um dos mais relevantes para a economia brasileira (CERVBRASIL, 2021).

Um avanço no crescimento do mercado cervejeiro vem sendo observado ao longo dos anos. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), 204 novas cervejarias foram registradas só em 2020. Com estes números, o Brasil alcançou a marca de 1383 estabelecimentos registrados em todo o país. Parte deste crescimento está relacionado às novas tendências de consumo, com destaque para o aumento das cervejarias artesanais (BRASIL, 2021).

As cervejas artesanais são identificadas como um produto de alto valor agregado e tem como principais características a variedade de cores, aromas e sabores (FREIRE et al., 2020). É uma bebida que está voltada para um público que busca diversidades, de modo que, para atender as exigências do perfil dos novos consumidores, o produtor de cerveja artesanal precisa ter como principal foco, a produção de uma bebida com qualidade e especificidade (RAMOS e PANDOLFI, 2019).

No processo de produção da cerveja, incluindo as artesanais, diversos compostos químicos são formados, devido às interações entre os seus componentes. Estes compostos, originados em diferentes etapas do processo de fabricação, principalmente na fermentação, contribuem significativamente na definição das propriedades sensoriais da bebida (NESPOR et

al., 2018). Durante este mesmo processo, alguns compostos indesejáveis também são formados. Tais compostos podem comprometer a qualidade da bebida, embora, segundo LOPES et al. (2018), tecnologias envolvendo o uso de equipamentos modernos, matéria-prima de boa qualidade e análises químicas do produto final vêm sendo usadas de modo a contribuir para a garantia do padrão de qualidade exigido para o produto. Dentre os compostos indesejáveis presentes na cerveja encontram-se os compostos carbonílicos. A presença destes podem alterar características sensoriais do produto promovendo cheiros e sabores desagradáveis (MASCIA et al., 2016).

Alguns compostos carbonílicos formados durante a produção da cerveja, além de, interferir nas propriedades sensoriais da bebida são prejudiciais à saúde humana. São exemplos o formaldeído e o acetaldeído (LAGO e WELK, 2019). Conforme consta na lista da Agência Internacional de Pesquisa sobre *Câncer* (IARC), estes compostos possuem características carcinogênicas já comprovadas (IARC, 2021). Uma preocupação com estes e outros efeitos têm motivado a comunidade científica na realização de estudos acerca de compostos carbonílicos em matrizes cervejeiras (RICO-YUSTE et al., 2016), os quais poderão contribuir para o monitoramento destas espécies na bebida e melhoria da qualidade do produto final.

Os padrões de qualidade para a cerveja no Brasil, são regulamentados através do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa - IN 65/2019, que estabelece os limites de tolerância para alguns parâmetros microbiológicos, físico-químicos, organolépticos e contaminantes inorgânicos (BRASIL, 2019), e através da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 65/2011, que por sua vez, estabelece limites para os aditivos alimentares (BRASIL, 2011). Essas legislações, entretanto, não fazem referências aos compostos carbonílicos, demonstrando assim a relevância desta pesquisa envolvendo a identificação e quantificação destes compostos em amostras reais de cervejas.

Os compostos carbonílicos (CC) são espécies químicas cujas características dificultam a sua quantificação individual através de métodos clássicos. Desta forma, métodos envolvendo o uso de técnicas cromatográficas vêm sendo utilizados como alternativa (CARDOZO et al., 2021). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido uma das técnicas aplicadas para esta finalidade (RICO-YUSTE et al., 2016). A natureza complexa dos compostos carbonílicos requer, além do uso de uma técnica instrumental adequada, um tratamento prévio das amostras antes da análise. Neste sentido a derivatização com o reagente 2,4-dinitrofenilhidrazina tem sido um tratamento comum para análise de compostos carbonílico por CLAE (CARDOZO et al., 2020; PENG et al, 2022). Para este trabalho, o procedimento descrito

em CARDOZO et al., (2020), foi adaptado, validado e aplicado na análise dos compostos carbonílicos em cervejas artesanais adquiridas no comércio de Salvador/Bahia.

Diante deste panorama e, considerando que poucos estudos demonstram a análise de compostos carbonílicos com massa moleculares maiores ou de espécies possivelmente ligadas a outras substâncias presentes na cerveja, este trabalho de pesquisa analisou 15 compostos carbonílicos (Formaldeído; Acetaldeído; Acroleína; Propionaldeído; Crotonaldeído; Metacroleína; Butiraldeído; Benzaldeído; Valeraldeído; Cicloexanona; Hexaldeído; Heptanal; Octanal; Nonanal; Decanal), todos na forma livre e ligada, em cervejas artesanais

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar e quantificar compostos carbonílicos livres e ligados em amostras reais de cervejas artesanais.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Adaptar método já existente para detecção de compostos carbonílicos em amostras aquosas, para analisar compostos carbonílicos livres e ligados, em cervejas artesanais;
- Avaliar as condições cromatográficas para análises dos compostos carbonílicos livres e ligados, em amostras de cervejas artesanais, usando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD);
- Validar o método cromatográfico adaptado para a determinação de compostos carbonílicos em cervejas artesanais;
- Analisar compostos carbonílicos livres e ligados em amostras reais de cervejas artesanais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A produção da cerveja

A cerveja é considerada uma das bebidas mais antigas da humanidade. Entretanto, não se sabe ao certo quando e onde foi produzida pela primeira vez. Documentos encontrados em cidades construídas 6.000 a.C., e resquícios de cevada encontrados por arqueólogos nas tumbas de faraós, por volta do século XIX, levaram algumas pessoas a acreditarem que a cerveja tenha sido originada no Oriente Médio ou no Egito (SILVA et al., 2016).

Outros registros também datados de 6.000 a.C., apontaram que a cerveja foi descoberta acidentalmente pelos povos Sumérios, na Mesopotâmia, quando foi verificado que cereais fermentados produziam como resultado uma bebida de sabor agradável que, atualmente, é conhecida como cerveja (PIMENTA et al., 2020).

No Brasil, a produção de cerveja teve início no século XVII, com a chegada de Maurício de Nassau que trouxe consigo o cervejeiro holandês Dirck Dick, responsável por montar a primeira cervejaria no Brasil. Por volta de 1650, os holandeses deixaram o Brasil e cerca de 150 anos depois, com a chegada da família real portuguesa no Brasil, houve abertura dos portos e a bebida pode ser então comercializada (ROSA e OLIVEIRA, 2020).

A bebida, que até então não era conhecida, começou a ser vendida pelos muitos comerciantes que se instalaram no Brasil. O início da produção, entretanto, não pode ser datado com precisão. O que se sabe é que o primeiro anúncio de venda de cerveja foi publicado no jornal do Comércio do Rio de Janeiro, em 27 de outubro de 1836 (SANTOS, 2003).

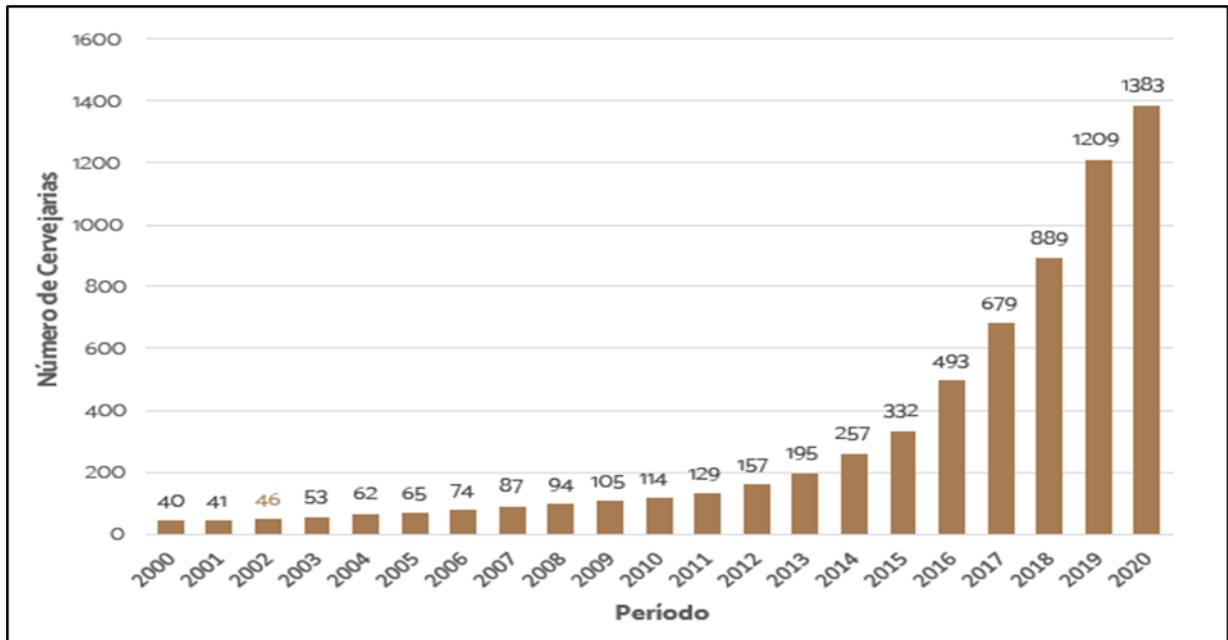
A cerveja é vista como uma das bebidas mais consumidas no mundo atual. É produzida a partir da fermentação de cereais maltados, ricos ou não em amidos, e aromatizada por lúpulo (LEÃO et al., 2018). É definida pela legislação brasileira como a

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

Ao longo dos anos, o mercado de cerveja vem se estabelecendo. Cerca de 14 bilhões de litros são produzidos, anualmente, no Brasil. Com esta produção, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial da bebida, sendo superado apenas pela China e Estados Unidos da América (EUA). Além da produção, o Brasil se destaca como um grande consumidor da bebida, ocupando a 17ª posição na escala mundial (CERVEBRASIL, 2021).

Além da produção e do consumo, um aumento da quantidade de estabelecimentos produtores da bebida também vem sendo observados nos últimos anos. Dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) informaram que 204 novas cervejarias foram registradas somente em 2020. Com estes números, o Brasil atingiu a marca de 1383 estabelecimentos distribuídos em todo o país. Grande parte deste aumento está relacionado a abertura de novas cervejarias artesanais (BRASIL, 2021). A Figura 1 apresenta o avanço do setor em termos de estabelecimentos registrados, compreendido entre os anos de 2000 e 2020.

Figura 1-Número de registro de estabelecimento produtores de cerveja, por ano, no Brasil.



Fonte: (BRASIL, 2021)

Conforme BRASIL (2009), as cervejas são classificadas de acordo os seguintes critérios:

a) Quanto ao extrato primitivo:

- Cerveja leve: é a cerveja na qual a concentração do extrato primitivo é maior ou igual a 5%, e menor que 10,5 % em massa;
- Cerveja comum: é a cerveja cuja extrato primitivo é maior ou igual a 10,5%, e menor que 12% em massa;
- Cerveja extra: o extrato primitivo é maior ou igual a 12%, e menor que 14% em massa;
- Cerveja forte: a concentração do extrato primitivo e maior que 14% em massa;

b) Quanto à cor:

- Cerveja clara: a cor corresponde a menos de 20 unidades EBC (European

Brewing Convention);

- Cerveja escura: a cor corresponde a 20 ou mais unidades EBC;
- Cerveja colorida: é a que, devido a adição de corantes naturais, apresenta cores diferentes dos padrões EBC;

c) Quanto ao teor alcoólico

- Cerveja sem álcool: quando o teor de álcool for inferior a 0,5% em volume;
- Cerveja com álcool: quando o teor alcoólico for superior a 0,5% em volume;

d) Quanto a fermentação:

- Cerveja de baixa fermentação (Ale);
- Cerveja de alta fermentação (Lager);

e) Quanto a proporção de malte:

- Cerveja: quando elaborada a partir de um mosto cujo extrato primitivo contém, no mínimo, 55% em massa de cevada malteada e, no máximo, 45% de adjuntos cervejeiros;
- Cerveja puro malte: quando elaborada a partir de um mosto cujo extrato primitivo provém, exclusivamente, de cevada malteada ou de extrato de malte;
- Cerveja 100% malte de (nome do cereal maltado): quando elaborada a partir de um mosto cujo extrato primitivo provém, exclusivamente, de outro cereal maltado;
- Cerveja de (seguida do nome do vegetal predominante): elaborada a partir de um mosto cujo extrato primitivo provém, majoritariamente, de adjuntos cervejeiros e a proporção de malte de cevada for maior que 20%, e menor que 55% em massa, sobre o extrato primitivo;

Quanto à composição original da cerveja, os ingredientes obrigatórios são: malte ou extrato do malte de cevada, água potável, lúpulo e levedura. Como ingredientes opcionais têm-se os adjuntos cervejeiros, que são outros tipos de cereais, maltados ou não, e que são aptos para o consumo humano. Estes adjuntos podem substituir uma parte do malte de cevada, em até 45% em massa. Este percentual, entretanto, pode variar de acordo com as características da cerveja a ser produzida (BRASIL, 2019).

Malte ou cevada malteada é o grão de cevada cervejeira submetido ao processo de malteação no qual o grão de cereal é submetido à germinação parcial, posterior desidratação, com ou sem tostagem, em condições adequadas (BRASIL,2019). Durante a malteação, são

produzidas as enzimas responsáveis por modificar as substâncias presentes no grão. O malte é a principal fonte de amido, o qual é convertido em açúcares para a produção do álcool na etapa de fermentação. O malte ainda contribui no encorpamento e na cor da cerveja (KUIAVSKI et al., 2020).

A água potável, usada para a fabricação da cerveja, deve atender a legislação específica estabelecida pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2019). Sendo o constituinte majoritário, suas propriedades químicas podem interferir no sabor do produto final. Para um bom desempenho do processo enzimático, por exemplo, recomenda-se que o pH da água esteja entre 5 e 7. Outra característica importante é a presença de sais na água como os de cálcio e magnésio, nas formas de sulfatos cloretos e outros. Estes sais contribuem para redução de acidez do malte, aumento da basicidade do mosto, acentuação do sabor e amargor, entre outros fatores (COELHO NETO et al., 2020).

A “solução em água potável de compostos resultantes da degradação enzimática do malte, com ou sem adjuntos cervejeiros e ingredientes opcionais, realizada mediante processos tecnológicos adequados” recebe o nome de mosto (BRASIL,2019). O mosto é, portanto, a solução rica em açúcares fermentáveis, resultante do processo de mosturação que consiste no amassamento do malte puro ou misturados com adjuntos cervejeiros em água quente (COELHO NETO et al., 2020).

O lúpulo é um importante ingrediente na produção de cervejas, sendo utilizados os cones da inflorescência da espécie vegetal *Humulus lupulus*, em sua forma natural ou industrializada, aptos para o consumo humano (BRASIL, 2019). É responsável por conferir à cerveja o sabor amargo e o aroma característico da bebida, devido a presença de grande quantidade de óleos essenciais presentes em sua composição. Além disso, possui ação antisséptica e bactericidas, que contribuem para a estabilidade do sabor e da espuma da cerveja (OLIVEIRA et al., 2017). Vale ressaltar que o amargor na cerveja depende da quantidade de lúpulo utilizada, da concentração de α -ácidos presente na planta e do tempo de fervura durante a fabricação. Em geral, os lúpulos do amargor são adicionados no início da fervura enquanto que os de aromas no final, afim de evitar a perda dos compostos aromáticos e voláteis que compõem o aroma e sabor da bebida (COELHO NETO et al., 2020).

Humulus lupulus é uma planta pertencente à família *Cannabaceae*, oriunda do Hemisfério Norte, sendo os países do Norte europeu e os EUA, os maiores produtores da espécie (OLIVEIRA et al.,2017). No Brasil, a planta é cultivada nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina. Contudo, as condições climáticas inadequadas e falta de informações técnicas como uso de defensivos agrícolas, a presença de ervas daninhas, a escolha

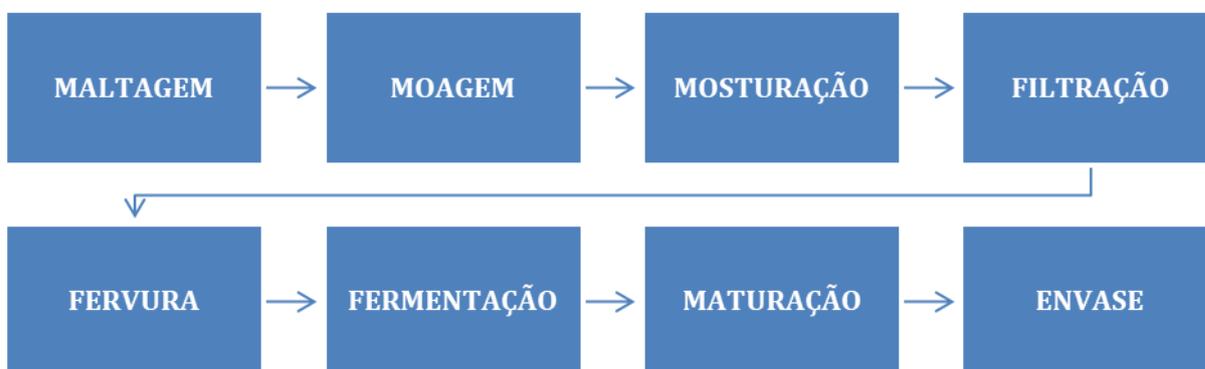
do sistema de condução, o período de poda, o ponto de colheita e os níveis de adubação são alguns dos fatores que têm dificultado o cultivo da planta no país (FAGHERAZZI E RUFATO, 2018).

As leveduras utilizadas na produção de cervejas, são microrganismos da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, unicelulares, desprovido de clorofila e que se reproduzem por aglomeração. Quando misturada ao mosto, em condições determinadas, metabolizam os açúcares fermentáveis, produzindo álcool majoritariamente, dióxido de carbono e outros compostos (PAYÁ et al., 2019). As leveduras são divididas normalmente em dois grupos: *Ale* (que são de alta fermentação) e *Lager* (que são de baixa fermentação).

As *Ales*, durante o processo de fermentação, atuam na superfície do líquido e o seu desempenho é mais eficaz numa faixa de temperatura entre 14°C e 25°C. O resultado é uma cerveja com sabor frutado, devido a formação de ésteres durante a fermentação. As *Lagers*, durante o processo situam-se no fundo do recipiente, onde a fermentação ocorre. Seu desempenho é melhor numa faixa de temperatura entre 4°C e 18°C. Esta condição favorece a baixa produção de ésteres resultando em cervejas com sabores maltados. O processo de fermentação, para os dois grupos, dura de três a cinco dias, em média, e o seu desempenho é avaliado em função da conversão dos açúcares em dióxido de carbono, e da baixa produção de compostos indesejáveis (COELHO NETO et al., 2020).

O processo de fabricação da cerveja poder ser descrito em várias etapas de acordo com a formulação empregada (COELHO NETO, 2020; PIMENTA et al., 2020; KEMPA et al.; 2017; PAYÁ et al., 2019; HUMIA et al., 2019). Oito etapas são consideradas principais: (i) maltagem, (ii) moagem, (iii) mosturação, (iv) filtração, (v) fervura, (vi) fermentação, (vii) maturação e (viii) envase. Um esquema representando as etapas do processo de produção da cerveja está apresentado na Figura 2.

Figura 2-Esquema do processo de fabricação da cerveja.



Fonte: adaptado de Pimenta et al., (2020)

i) **Maltagem**: consiste na germinação do grão de cevada ou de outros cereais em condições ambientais controladas;

ii) **Moagem**: consiste na trituração do malte para romper a casca e deixar a parte interna do grão exposta e, assim, facilitar a separação da casca e do grão e o contato com a água;

iii) **Mosturação**: consiste na produção do mosto. Coloca-se o malte triturado em contato com a água e submete-se a um aquecimento gradativo de 40°C a 78°C, com auxílio de uma rampa de temperatura. Entre 40°C e 45°C, ocorre a hidratação do grão e ativação das enzimas α -amilase e β -amilase, responsáveis por converter o amido do cereal em açúcares fermentáveis. Entre 50°C e 55°C, ocorre a quebra das proteínas que envolvem o amido. Entre 60°C e 72°C, acontece a ação das enzimas sobre o amido. Entre 76°C e 78°C, no final do processo, ocorre inativação das enzimas α -amilase e β -amilase. O tempo de permanência em cada intervalo de temperatura depende da formulação escolhida e dos resultados pretendidos por cada fabricante. O tempo total da mostura gira em torno de 60 minutos e o resultado é um líquido açucarado denominado mosto;

iv) **Filtração**: nesta etapa o mosto resultante é filtrado para remoção do bagaço do malte.

v) **Fervura**: o mosto é aquecido a 100°C para que ocorra a esterilização. A etapa dura em torno de 60 minutos, podendo variar de acordo com a formulação. Nessa fase, ocorre a adição do lúpulo. A elevada temperatura favorece a conversão dos α -ácidos (humulones) em seus isômeros iso- α -ácidos (iso-humulones), responsáveis pelo amargor da bebida. Após o tempo de fervura o mosto é resfriado até a temperatura entre 14°C e 25°C (alta fermentação) ou entre 4°C e 18°C (baixa fermentação), para a inoculação da levedura e início da fermentação alcohólica;

vi) **Fermentação**: ocorre em recipientes fechados (tanques fermentadores) equipados com válvulas que permitem a liberação de dióxido de carbono (CO₂) produzido e, ao mesmo tempo, impedem a entrada de ar ambiente, viabilizando o controle da pressão e impedindo o contato com o ambiente externo para evitar contaminações. Esta fase dura, em média, de cinco a dez dias. O resultado é um líquido rico em álcoois;

vii) **Maturação**: consiste em um método de remoção de sabores estranhos. A cerveja “verde” (recém produzida), resultante da fermentação, é retirada do tanque fermentador (com leveduras inativas) para um tanque isento de impurezas (tanque maturador) onde a cerveja é mantida por trinta dias ou mais, dependendo do estilo da cerveja desejado. Esta etapa é importante para que leveduras, ainda ativas, continuem a produzir CO₂ para eliminar compostos voláteis indesejáveis;

viii) **Envase**: é a última etapa do processo de produção da cerveja e pode ser feito em

recipientes diversos tais como latas, garrafas, barris de aço inox e/ou vidro;

Vale ressaltar que o esquema da Figura 2 pode ser aplicado para a produção de qualquer tipo de cerveja e, sendo necessário, outras etapas poderão ser incluídas.

2.1.1 Cerveja artesanal

De acordo com a CERVESIA (2021), a definição de cerveja artesanal tem dividido opiniões no Brasil. O termo artesanal faz referência a tudo que é feito de forma manual sem recursos industriais e/ou técnicas elaboradas. Especialistas da área entendem que a qualidade da matéria-prima, os ingredientes, o tempo de maturação, a não utilização de aditivos e outros fatores subjetivos deveriam ser considerados para conceituar o produto.

Na ausência de uma definição oficial, as cervejas artesanais vêm sendo consideradas como aquelas produzidas em pequena escala e desenvolvidas com ingredientes tradicionais como a cevada maltada, e com uma quantidade maior de malte por litro, quando comparada às cervejas convencionais (SCHABO et al., 2021). Para Ferreira (2019), a cerveja artesanal pode ainda ser definida como aquelas que são produzidas em pequena escala e associada a um processo de fermentação lenta, sem adição de preservantes, estabilizantes, corantes ou que contenha algum diferencial em comparação às cervejas industrializadas.

De acordo com o histórico, a cerveja era produzida de forma artesanal e apenas para consumo familiar até o final do século XIX, principalmente por imigrantes europeus instalados no Brasil. Com o aumento de impostos e as dificuldades para importação de outras bebidas, no final daquele século, o consumo da cerveja ganhou força e o resultado foi o aumento da produção, geração de empregos e crescimento do setor (RAMOS e PANDOLFI, 2019).

Com o avanço da industrialização no país, no início no século XX, e o crescimento da produção de cerveja em grande escala, muitas cervejarias pequenas foram compradas pelas grandes marcas produtoras de cervejas industrializadas, já estabelecidas no mercado, aumentando ainda mais a queda na produção de cerveja artesanal. Além disso, o baixo custo da bebida produzida pelas grandes indústrias contribuiu significativamente para o declínio das cervejarias artesanais. Somente a partir de 1990, a produção artesanal deu início a sua retomada no país (SEBRAE, 2021).

Até o início do século XX, o mercado de cerveja no Brasil era disputado por grandes grupos produtores de cerveja em larga escala. Atualmente, dois tipos de cerveja vêm se destacando no mercado brasileiro: a cerveja industrializada, produzida por grandes empresas e líderes no mercado nacional, e as de diferentes estilos, oriundas de cervejaria artesanais e microcervejarias, que atendem o mercado regional (DALLA SANTA et al., 2020).

Alguns fatores diferem as cervejas artesanais das industriais. As artesanais são produzidas em cervejarias artesanais ou microcervejarias, produzidas em menor volume e os ingredientes, em particular o lúpulo e o malte, são adicionados em quantidades diferenciadas, conferindo características peculiares à bebida (TOMASI e FORTES,2019). Além disso, possuem estilos únicos e fórmulas exclusivas que lhe conferem melhores aromas e sabores (LOPES et al., 2018).

O seguimento das cervejas artesanais visa a produção de um produto com alto valor agregado, por utilizarem processos de fabricação e/ou ingredientes diferentes das cervejarias em larga escala. O seu intuito é atender tradições e obter qualidade diferenciada. Além disso, o uso de ingredientes tais como folhas, sementes, frutas, entre outros, contribui largamente para as características da bebida, favorecendo a diversidade de oferta (DALLA SANTA et al., 2020).

Um crescimento no segmento de cervejas artesanais vem sendo observado, ao longo dos anos. Este consumo tem sido marcado por um público seletivo e mais exigente acerca da qualidade da bebida (FERREIRA, 2018). Para este público, as cervejas de massa são denominadas como sem sabor, enquanto as artesanais têm estilo e alta qualidade (MELLO e SILVA, 2020). Tendo em vista um mercado onde as cervejas industrializadas produzidas por grandes grupos são predominantes (MELLO et al., 2017), as cervejas artesanais, mesmo produzidas em pequena escala, vêm tendo seu espaço cada vez mais consolidado (KEMPA et al., 2017).

Dar atenção aos clientes e procurar atender as suas necessidades e expectativas é indispensável para toda e qualquer atividade. Tal entendimento permitirá a empresa produtora adequar o seu processo (MELLO e SILVA, 2020). Um estudo realizado pelo Sebrae entre o ano de 2018 e 2020 mostrou o interesse dos produtores de cerveja artesanais pela busca de qualificação pessoal e tecnologias que possam contribuir para melhoria contínua dos processos em toda a cadeia produtiva da bebida (SEBRAE, 2021a).

Para a produção de cervejas artesanais, faz-se necessário a definição de um estilo, criação de uma receita, seleção de ingredientes, moagem do malte, mosturação, clarificação, fervura, fermentação, maturação e envasamento. Ou seja, em linhas gerais o processo é comum para todos os fabricantes. O diferencial entre um e outro basicamente é o tipo de ingredientes selecionados (SEBRAE, 2021).

Várias opções de ingredientes, além dos obrigatórios e definidos legalmente, podem ser agregadas de forma a contribuir com o sabor, aroma e outras características da bebida. Portanto, inovar neste seguimento para se manter competitivo é: priorizar a qualidade dos ingredientes, investir em insumos locais, divulgar a identidade do produto, contribuir para o crescimento do

local e/ou região onde o produtor se encontra instalado, fazer uso de técnicas de produção e desenvolver novos estilos e variedades de sabores (SEBRAE, 2021). Neste sentido, alguns estudos envolvendo o uso de ingredientes não tradicionais têm sido apresentados na literatura.

Kempa et al. (2017), utilizaram mel silvestre, mel de eucalipto e mel de uva japonesa, como adjunto cervejeiro na produção de cerveja artesanal de alta fermentação (ALE), a fim de avaliar a influência do mel no produto final. As cervejas foram formuladas com adição de 35% de adjunto cervejeiro (mel) em relação ao extrato do mosto original (malte de cevada). Na caracterização das amostras de mel e das cervejas produzidas, foram analisados os seguintes parâmetros físico-químicos: pH, °Brix, acidez livre, lactônica e total, hidroximetilfurfural, açúcares redutores totais, atividade diastásica, reação de Lund e reação de Lugol. Para estes parâmetros, os resultados obtidos mostraram que as amostras produzidas apresentaram características físico-químicas coerentes com os padrões estabelecidos na legislação. Quanto ao teor alcoólico, as cervejas com mel apresentaram resultados inferiores quando comparadas com a cerveja referência (sem adição de mel). Os autores concluíram que novas proporções do adjunto devem ser testadas afim de evitar a inibição por excesso de substrato e promover o aumento do teor alcoólico.

Dalla Santa et al (2020) utilizaram a fruta pitaya, de polpa vermelha, na elaboração de cerveja artesanal de alta fermentação para avaliar a contribuição da fruta na bebida. As cervejas obtidas foram caracterizadas físico-quimicamente através dos parâmetros: pH, sólidos solúveis, extrato seco, fenólicos totais e análise colorimétrica. Os resultados mostraram que para os parâmetros físico-químicos não foram apresentadas alterações significativas com a adição da pitaya. O teor alcóolico variou entre 5,75% e 6,85%, considerado satisfatório pelos autores. A adição da fruta elevou a concentração de compostos fenólicos totais, que são benéficos para a saúde, sugerindo a migração dos compostos presentes na fruta para a cerveja. A cor na amostra onde foi usada 20 g L⁻¹ da polpa da fruta, apresentou tom mais escuro, impactando positivamente na aparência da bebida. Os autores concluíram que a adição da fruta pitaya na cerveja contribuiu com características envolvendo a cor e o teor de fenólicos sem interferir no processo e qualidade do produto final.

De Lima et al. (2021) utilizaram polpa de pitanga na produção de cerveja artesanal de alta fermentação para avaliar as características físico-químicas da bebida, após o processo de clarificação. Foram analisados os seguintes parâmetros físico-químicos: sólidos solúveis (SS), pH, acidez total, resíduo seco, extrato real e teor alcoólico. Todos os resultados físico-químicos encontrados foram satisfatórios. De acordo com os autores as caracterizações das cervejas com adição de polpa de pitanga apresentaram resultados similares aos valores da literatura para este

estilo de cerveja. Os autores ainda sugeriram a realização de teste sensorial em trabalhos futuros, afim de avaliar a aceitação do mercado.

Com base nas informações anteriores é possível verificar que o uso de ingredientes não convencionais como frutas e especiarias na cerveja tem sido uma alternativa para atender um mercado que tem se tornado cada vez mais adepto aos novos estilos e sabores de cervejas. Vale ressaltar que a escolha adequada destes ingredientes, a combinação destes com os ingredientes obrigatórios e o processo de fabricação, são critérios que devem ser observados visando um produto final diferenciado e com qualidade.

2.2 Padrões de qualidade para a cerveja

A fermentação, condições ambientais, cepa de leveduras e as matérias-primas (principalmente malte e lúpulo) são fatores que contribuem para o perfil químico da cerveja, promovendo a formação de compostos que contribuem para a composição do aroma e sabor característicos da bebida. Entretanto, a combinação destes fatores também pode promover a formação de compostos com características indesejáveis (COELHO NETO, 2020).

Agentes químicos e microbiológicos são exemplos de contaminantes que podem estar presentes na cerveja. Estes podem ser oriundos diversas tais como: matérias-primas, do processo de fabricação ou ainda do próprio ambiente da cervejaria (RODHOUSE e CARBONERO,2017). Para os fabricantes da bebida, que buscam se manter num mercado extremamente competitivo, ter o processo envolvido em um caso de contaminação, de qualquer natureza, pode comprometer e muito a confiabilidade do produto (GOODMAN,2020).

No tocante à contaminação por agentes microbiológicos, a cerveja é considerada um alimento seguro. Isso se deve a presença do etanol, do dióxido de carbono, dos ácidos amargos do lúpulo e o baixo pH que, juntos, contribuem para a formação de um ambiente desfavorável ao crescimento da maioria dos microrganismos de degradação da cerveja. Contudo, um grupo pequeno de microrganismos resistentes a este ambiente podem crescer e promover a degradação da bebida. Dentro deste grupo, os Lactobacilos são os mais comuns, sendo a espécie *Lactobacillus brevis*, “a bactéria de deterioração mais significativa”. Esta bactéria pode ser encontrada em todas as etapas do processo de fabricação, no processo de embalagem e no armazenamento (RIEDL, et al., 2018).

Agentes químicos de natureza inorgânica encontradas na cerveja, podem ser oriundos de fontes como: solo, água, cereais, lúpulo, levedura e ainda da contaminação do ambiente. Estes agentes podem alterar as características do produto como por exemplo a clareza e o sabor

da bebida (ANDERSON et al., 2019), comprometendo a sua qualidade (LEÃO et al., 2017). Espécies químicas de natureza orgânica, como por exemplos os aldeídos, por sua vez, podem interferir nas características sensoriais da bebida, contribuindo para a formação de aromas e sabores desagradáveis (ANDERSON et al., 2019).

No Brasil, os padrões de qualidade da cerveja são regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio Instrução Normativa (IN) nº 65, de 10 de dezembro 2019 (IN 65/2019) e pela Agência de vigilância Sanitária (ANVISA), através da Diretoria Colegiada RDC Nº 65, de 29 de novembro de 2011. A IN 65/2019 estabelece os padrões de identidade e qualidade para cervejas por meio das análises de parâmetros microbiológicos, físico-químicos, organolépticos e contaminantes inorgânicos (BRASIL, 2019), enquanto que a RDC 65/2011 estabelece os limites para os aditivos permitidos para a cerveja (BRASIL, 2011). Os valores de referências estabelecido por ambas as legislações citadas estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1- Padrões de Identidade e Qualidade para cerveja.

1 - Parâmetro microbiológico	Tolerância	
Coliformes a 35°C/50mL	Ausência	
2 - Parâmetros Físico-químicos	Mínimo	Máximo
Gradação alcoólica, %v v ⁻¹ a 20°C, para cervejas (art. 2º)	0,5	54
Gradação alcoólica, %v v ⁻¹ a 20°C, para cervejas sem álcool (art. 11, I)		0,5
Gradação alcoólica, %v v ⁻¹ a 20°C, para cervejas sem álcool (art. 31)		0,05
Gradação alcoólica, %v v ⁻¹ a 20°C, para cervejas com teor alcoólico reduzido (art. 11 incisos II)	0,51	2
Extrato primitivo Ep, % m.m ⁻¹ (art. 7º, §1º)	5	
Quantidades de adjuntos na cerveja em porcentagem de massa do Ep em (% m.m ⁻¹)		45
Quantidades de adjuntos na cerveja puro malte	Ausente	-
Corantes artificiais	Ausente	-
Edulcorantes	Ausente	-
3 - Parâmetros Organolépticos		
Aromas estranhos	Ausente	
Aspectos sensoriais	Límpido ou turvo, com ou sem presença de sedimentos próprios	
4 - Contaminantes inorgânicos	Tipo de cerveja	Máximo
Arsênio (mg L ⁻¹)	Alcoólica	0,1
	Analcóolica	0,05
Chumbo (mg L ⁻¹)	Alcoólica	0,2
	Analcóolica	0,05
Cádmio (mg L ⁻¹)		0,02
Estanho (mg L ⁻¹) para bebidas enlatadas		150

Fonte: Adaptada de Brasil, (2019).

Ep=Extrato primitivo; Analcóolica = sem álcool

Tabela 2-Aditivos alimentares e seus limites permitidos pela legislação brasileira, para cervejas.

Aditivos	Limite Máximo (g/100g ou g/100mL)
Acidulantes/reguladores de acidez	
Ácido láctico (L-, D- e DL-)	Quantum satis*
Ácido málico (D-, L-)	Quantum satis
Ácido cítrico	Quantum satis
Ácido fosfórico, ácido <i>orto</i> -fosfórico	0,044 (como P)
Antiespumantes	
Dimetilsilicone, dimetilpolisiloxano, polidimetilsiloxano	0,001
Antioxidantes	
Dióxido de enxofre, anidrido sulfuroso	
Sulfito de sódio	
Bissulfito de sódio, sulfito ácido de sódio	
Metabissulfito de sódio	0,005 (como SO ₂ sozinhos ou em combinação)
Metabissulfito de potássio	
Sulfito de potássio	
Bissulfito de cálcio, sulfito ácido de cálcio	
Bissulfito de potássio	
Ácido ascórbico (L-)	0,03
Ascorbato de sódio	0,03 (como ác. ascórbico)
Ascorbato de cálcio	0,03 (como ác. ascórbico)
Ascorbato de potássio	0,03 (como ác. ascórbico)
Ácido eritórbico, ácido isoascórbico	0,01 (como ác. eritórbico ou isoascórbico)
Eritorbato de sódio, isoascorbato de sódio	0,01 (como ác. eritórbico ou isoascórbico)
Tiosulfato de sódio	0,005 (como SO ₂ sozinho ou em combinação)
Aromatizantes	
Aromatizantes naturais (somente óleo essencial, essência natural ou destilado vegetal de sua origem)	Quantum satis
Corantes	
Riboflavina	0,01
Carmim, cochonilha, ácido carmínico, sais de Na, K, NH ₄ e Ca	0,01 (como ác. carmínico)
Clorofila	Quantum satis
Vermelho de beterraba, betanina	Quantum satis
Caramelo I – simples	Quantum satis
Caramelo III – processo amônia	5,0
Caramelo IV – processo sulfito-amônia	5,0
Carotenos: extratos naturais	0,06
Estabilizantes	
Alginato de propileno glicol	0,007
Goma arábica, goma acácia	Quantum satis
Goma xantana	Quantum satis
Pectina, pectina amidada	Quantum satis
Metilcelulose	Quantum satis
Hidroxipropilmetilcelulose	Quantum satis
Carboximetilcelulose sódica	Quantum satis

Fonte: adaptada de Brasil, (2011); *Quantum satis = quantidade suficiente para

Conforme observado nas tabelas anteriores, as legislações citadas não fazem referência aos compostos carbonílicos livres e/ou ligados. A ausência de valores de referências para estes compostos é um dos fatores de relevância para o desenvolvimento de estudos envolvendo a identificação e a quantificação destas substâncias na cerveja, contribuindo para melhoria da qualidade da bebida.

2.3 Compostos Carbonílicos

Os compostos carbonílicos são classificados como toda e qualquer molécula orgânica que possua, em sua estrutura, pelo menos um grupo funcional carbonila, representado como $R_2C=O$. Estes compostos podem ser originados de contaminação de petróleo e etanol, de matérias-primas das indústrias alcoolquímicas e petroquímicas, da extrusão a altas temperaturas usadas no processo de produção de polímeros e, ainda de reações fotoquímicas de hidrocarbonetos. Na natureza, os compostos carbonílicos podem ainda ser formados a partir de fontes naturais (como queimadas de florestas) e pela ação do homem (como emissões veiculares) (VIEIRA et al., 2012).

A exposição humana aos compostos carbonílicos, podem ocorrer de três maneiras distintas: (i) exposição cutânea, que ocorre através da epiderme com o uso em cosméticos; (ii) inalação, que ocorre por exposição aos altos níveis destes compostos no ar ambiente; e (iii) exposição por ingestão, que pode ocorrer através do consumo de diversos tipos de alimentos e bebidas. Espécies como os aldeídos estão presentes em diversos materiais e são bastante usadas nas indústrias têxteis, alimentícias e farmacêuticas, podendo ainda serem utilizados como conservantes em cosméticos. Nos alimentos, os compostos carbonílicos são encontrados numa ampla variedade de produtos tais como: vegetais, frutas, laticínios, e em diversos tipos de bebidas alcoólicas (LAGHRIB et al., 2019).

No vinho, por exemplo, os compostos carbonílicos são originados, principalmente, nas etapas de fermentação e maturação; porém, existem relatos da presença de formaldeído, acetaldeído, acroleína, furfural em todas as fases da vinificação, incluindo nas uvas e no produto final (PETERLE et al., 2019). Na cerveja, os compostos carbonílicos podem ser originados durante a queima do malte, favorecendo a formação de derivados furanos, nas etapas de mosturação, fermentação e maturação. Sendo a fermentação alcoólica, a etapa de maior contribuição para a formação destas substâncias (ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2016).

A presença de carbonílicos na cerveja influenciam significativamente nas propriedades sensoriais, principalmente, no sabor e cheiro característicos da bebida (NCUBE et al., 2020).

Além disso, alguns compostos carbonílicos podem formar, no organismo humano, uma série de compostos conhecidos como “adutos”, os quais podem interagir com o DNA - ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*), promovendo mutações e aumentando o risco de câncer em algumas partes do organismo (PETERLE et al., 2019). Na lista de classificação da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), alguns compostos carbonílicos estão entre os que apresentam características carcinogênicas (IARC, 2021). O acetaldeído e o formaldeído ingeridos especificamente por meio de bebidas alcólicas, encontram-se listados no Grupo 1 (compostos com carcinogenicidade confirmada para humanos). A acroleína e o furfural estão no Grupo 3 (compostos cuja carcinogenicidade ainda estão em estudo) (LAGO e WELK, 2019).

Outras doenças capazes de representar riscos à saúde humana podem estar relacionadas a exposição aos compostos carbonílicos. O formaldeído pode estar relacionado a leucemia e o câncer de nasofaringe. Já o furano e o furfural estão associados a neoplasias hepáticas (carcinomas). A acroleína pode contribuir para a esclerose múltipla, doença de Alzheimer, doenças cardiovasculares, hepato e nefrotoxicidade (FERREIRA et al., 2018a). O acetaldeído pode aumentar o risco de câncer em várias partes do corpo tais como fígado, trato aerodigestivo superiores, intestino grosso e mamas.

Outro efeito causado pelo acetaldeído é a veisalgia, mais conhecida como “ressaca do dia seguinte”. Este efeito ocorre após o consumo de bebidas alcoólicas, a exemplo da cerveja. Os altos níveis desta substância no organismo, resultante também da conversão do etanol. Entre os sintomas da ressaca encontram-se dor de cabeça, náuseas, sonolência, fadiga e vômito (SRINIVASAN et al, 2019). Presente no discurso da grande maioria dos consumidores de bebidas, incluindo as cervejas artesanais, com a intenção de comunicar o estado de debilidade da saúde física a que são acometidos no dia seguinte ao de uma bebedeira a ressaca pode, talvez, ser a denúncia que o próprio organismo faz a respeito da possível agressividade que os compostos carbonílicos lhe causam. Diversos trabalhos abordando a presença de compostos carbonílicos em bebidas são encontrados na literatura.

ZACARONI et al. (2011) analisaram furfural e acroleína em aguardentes de cana. As concentrações de furfural variaram de 4,28 a 39,78 mg/100mL de álcool anidro, enquanto que para a acroleína os valores variaram de não detectado a 7,45 mg/100mL de álcool anidro. Dos resultados encontrados para o furfural, 83% apresentaram valores acima do estabelecido pela legislação brasileira para aguardentes, que é de 5 mg/100 mL de etanol. Para a acroleína, apenas uma amostra apresentou valor acima do estabelecido pela legislação.

MASSON et al. (2012) analisaram presença de acroleína e outros compostos em

aguardentes de cana produzidas no Norte e Sul de Minas Gerais. As concentrações encontradas para a acroleína variaram de não detectado a 25,95 mg/100mL de etanol. 71 amostras foram analisadas e, destas, 9,85% apresentaram níveis acima do estabelecido pela legislação brasileira (5 mg/100mL de etanol) para aguardentes.

FERNANDES et al. (2018) analisaram amostras de vinho tinto produzidas em várias regiões do Brasil. Nas amostras, foram identificados os compostos carbonílicos (E) -2-nonenal, decanal e 1,1-dimetil-2-propanona. As concentrações encontradas não foram informadas por se tratar de uma análise qualitativa, indicando apenas presença ou ausência dos compostos alvos.

FERREIRA et al. (2019a) analisaram compostos carbonílicos (formaldeído, acetaldeído, acroleína e furfural) em amostras de mosto de uva e vinho. Os resultados encontrados para o mosto e o vinho foram: formaldeído (não quantificado para as duas matrizes), acetaldeído de 19,9 a 34,9 $\mu\text{g L}^{-1}$ (mosto) e 30,1 a 44,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (vinho); acroleína 40,2 a 50,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ (mosto) e 1,0 a 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (vinho); furfural 5,6 a 7,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (mosto) e < 0,7 a 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (vinho).

Adicionalmente, WANG et al. (2012) analisaram formaldeído em diferentes tipos de cervejas. As concentrações encontradas variaram de 172 a 385 ng mL⁻¹.

RICO-YUSTE et al. (2016) analisaram o composto carbonílico furfural em amostras de cervejas envelhecidas. Os resultados encontrados foram 202, 330, 366 e 687 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os respectivos dias de armazenamento (49, 187, 284 e 627 dias), indicando que há possibilidade de formação deste composto durante o período de envelhecimento da bebida, devido ao aumento gradativo da concentração deste contaminante ao longo desta etapa do processo produtivo, podendo comprometer a qualidade do produto final.

A presença de compostos carbonílicos em diferentes tipos de bebidas alcóolicas, e em diversos níveis de concentração, conforme apontaram os estudos citados, são alguns dos fatores que têm motivado o estudo destas espécies em cervejas artesanais (HERNANDES ET AL., 2020).

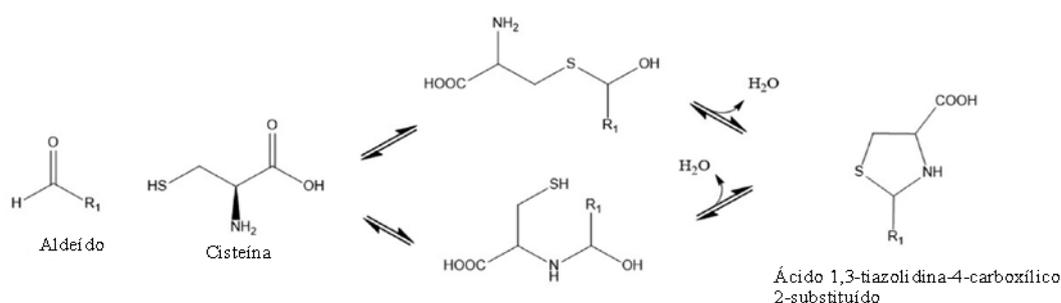
Os compostos carbonílicos podem estar presentes na cerveja em duas formas: livres e/ou ligados. Na forma livre, contribuem significativamente para o sabor da bebida. Na forma ligada, estes compostos não são evaporados e nem são transformados em seus álcoois correspondentes, o que dificulta a sua percepção do ponto de vista analítico e sensorial (LEHNHARDT et al., 2019).

A formação dos compostos ligados é favorecida pela alta reatividade dos carbonílicos. Estes compostos podem reagir com vários outros compostos presentes na cerveja. A baixa volatilidade destas espécies ligadas é um dos fatores que dificultam sua eliminação durante o

aquecimento do mosto e ação das leveduras na etapa de fermentação sendo levados até o produto final. Estes compostos, ligados a intermediários como iminas, bissulfito, cisteína, proteínas e outros, que possivelmente se encontram presentes na matriz cervejeira, são considerados os mais relevantes para a formação dos sabores desagradáveis da cerveja (TRUEBA et al., 2021).

O mecanismo claro de como essas interações ocorrem ainda não foi esclarecido na literatura. Entretanto, sendo a cisteína e o bissulfito intermediários bastantes conhecidos nos produtos cervejeiros, a formação de carbonílicos ligados a estas espécies é bastante viável. Conforme propõe TRUEBA et al. (2019), uma forma esquemática de representação das reações químicas para os compostos carbonílicos ligados em cervejas está representada na Figura 3.

Figura 3-Representação esquemática das reações químicas envolvendo a formação de CC ligados em cervejas.



Fonte: Adaptado de TRUEBA et al., (2019)

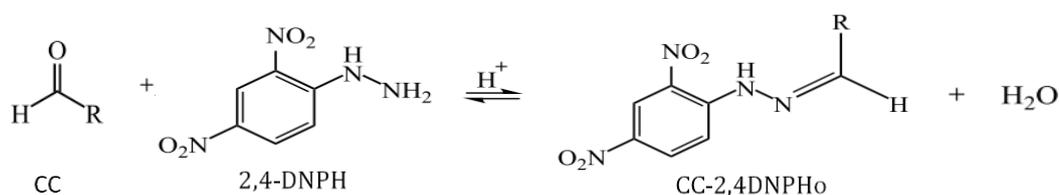
2.4 Métodos utilizados para análise de compostos carbonílicos

Os métodos de referência adotados no Brasil, pelo Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento (MAPA), para análise de cervejas são aqueles padronizados pela *Association of Official Analytical Chemists (AOAC)*, *European Brewing Convention (EBC)* e pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL). Para análise de aldeídos totais, em particular, o recomendado pelo IAL e AOAC é um método titulométrico clássico, baseado na reação entre bissulfito e aldeídos presentes na amostra, titulado com solução de iodo, na presença de amido (IAL 2008). Este método, entretanto, quantifica somente os aldeídos na sua forma total e a expressão dos resultados é dada em função apenas do acetaldeído (BRASIL, 2009). Esta limitação inviabiliza a aplicação deste método na análise de vários compostos de forma individual e simultânea.

A determinação de compostos carbonílicos, entretanto, tem sido um desafio entre a comunidade científica. A ausência de propriedades cromóforas, a volatilidade e a alta reatividade são algumas das características destes compostos que dificultam a sua detecção.

(ZHAO, 2016). Assim sendo, tratamentos envolvendo reações de derivatização vem sendo usados como alternativa no tratamento de amostras. A derivatização visa melhorar a detecção e tornar os analitos mais estáveis. Como derivatizantes, reagentes a base de hidrazonas são comumente usados para modificação de compostos carbonílicos, sendo a 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) o reagente habitualmente mais usado (KISHIKAWA, 2019). Um esquema da reação de derivatização dos compostos carbonílicos por meio do uso da 2,4-DNPH é apresentado na Figura 4.

Figura 4-Esquema da reação de derivatização de compostos carbonílicos (CC).



Fonte: Adaptado de WILLIAMS et al. (2019). CC-2,4-DNPHo = 2,4-dinitrofenilhidrazona do CC

Outro fator que dificulta a quantificação de compostos carbonílicos e requer atenção é a massa molecular. Os compostos de massas moleculares elevadas, quando presentes nas amostras, geralmente são encontrados a níveis de traços, tornando necessário o uso da pré-concentração para que sejam detectados. Neste sentido a extração em fase sólida (SPE- *Solid-phase extraction*) é um dos principais métodos empregado na pré-concentração de analitos traços, incluindo compostos carbonílicos (CARDOZO, 2021).

A extração em fase sólida pode ser aplicada em diversos tipos de amostras como: bebidas, alimentos, ambientais e biológicas entre outras. O seu princípio básico consiste em transportar uma solução através de uma fase sólida (em geral um cartucho contendo sorvente), com capacidade para reter os analitos de interesse. Depois de retidos os analitos são eluídos, com solventes apropriados, diretamente para o recipiente de coleta. Estes solventes são responsáveis pela dessorção dos analitos de interesse, da fase sólida (ANDRADE-EIROA et al., 2016). Algumas das vantagens deste método é o alto fator de concentração, a extração múltipla e simultânea dos analitos e o uso de baixo volume de solventes orgânicos. Contudo, algumas desvantagens como o custo elevado dos cartuchos e dos dispositivos multivias (*manifolds*), alto tempo de análise, entre outras, devem ser consideradas (JARDIM, 2010; AGUIAR JÚNIOR, et al., 2018; CARDOZO et al., 2021).

A aplicação de metodologias envolvendo o uso de técnicas instrumentais, como por exemplo a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), têm sido utilizadas como alternativa no processo de análise de compostos carbonílicos em bebidas alcoólicas, incluindo a cerveja.

(ZHAO, 2016; RICO-YUSTE et al., 2016). Algumas das vantagens que favorecem do uso da CLAE são: a eficiência na separação, a identificação e quantificação de componentes químicos em misturas, análises simultâneas de vários compostos e a possibilidade de acoplamento de um cromatógrafo com sistemas distintos de detecção. Esta combinação, em geral, contribui na melhoria da seletividade, diversificação dos compostos detectados além de outras informações que podem ser úteis para o processo de análise (KISHIKAWA, 2019). O uso de técnicas cromatográficas, na análise dos compostos carbonílicos em amostras de cerveja e seus componentes, têm sido apresentados em diferentes estudos na literatura.

ZHAO et al. (2016) analisaram compostos carbonílicos em amostras de cerveja utilizando a técnica de cromatografia líquida equipada com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD). O composto identificado foi formaldeído, usando acetonitrila como solvente extrator e como derivatizante o reagente cloridrato de etoxiamina (EAHC). O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram definidos de acordo com a relação sinal/ruído da linha de base e os valores encontrados foram respectivamente $0,016 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,042 \text{ mg L}^{-1}$. As concentrações encontradas nas amostras variaram entre $0,17 \text{ mg L}^{-1}$ a $0,62 \text{ mg L}^{-1}$ de formaldeído. De acordo com o autor o derivatizante (EAHC) foi eficaz para a detecção de traços de formaldeídos, sendo uma alternativa ao uso de 2,4-DNPH como agente derivatizante.

REICHEL et al. (2021) analisaram compostos carbonílicos em amostras de cevada, malte pilsen, malte caramelo, malte chocolate e malte preto (componentes da cerveja). Os compostos analisados foram: hidroxiacetona (isômero Z), acetoína (isômero Z), hidroxiacetona (E-isômero), acetaldeído, 2-metiloxolan-3-ona, acetona, furfural, propanal, 5-metilfurfural, 2-butanona, butanal, 3-metilbutanal, 2-metilbutanal, pentanal, metilglioxal, hexanal, 2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona. A técnica de cromatografia líquida equipada com detector de arranjo de diodos e espectrômetro de massas com ionização por eletrospray (HPLC-DAD-ESI-MS/MS) foi usada para a identificação dos compostos. Como solvente extrator foi utilizada acetonitrila e 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) como derivatizante. Os limites de detecção e de quantificação, assim como concentrações encontradas não foram informados no trabalho. Os autores concluíram que a proposta, baseada na extração em baixa pressão, mostrou-se eficaz para o preparo de amostras para análise qualitativa de compostos carbonílicos nas matrizes estudadas.

HERNANDES et al. (2019) analisaram os compostos carbonílicos acetaldeído, acroleína, formaldeído e furfural, em amostras de cervejas, usando a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS-SIM), para identificar e quantificar os compostos. O reagente 2,2,2-trifluoretilhidrazina (TFEH) foi usado como derivatizante. Para

os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), os valores encontrados foram, respectivamente: acetaldeído (0,03 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), acroleína (0,3 e 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$), formaldeído (0,3 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), furfural (0,1 e 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). As concentrações encontradas para os compostos analisados foram: acetaldeído (1,3 a 1,63 $\mu\text{g L}^{-1}$), acroleína (2,6 a 5,4 $\mu\text{g L}^{-1}$), formaldeído (2,6 a 385 $\mu\text{g L}^{-1}$), furfural (1,15 a 4264,3 $\mu\text{g L}^{-1}$). Algumas amostras apresentaram resultados entre o LD e o LQ, sendo, portanto, estes níveis detectados, mas não quantificados. Os autores concluíram que o método proposto se mostrou satisfatório para quantificação dos compostos analisados na matriz estudada. Os dados de validação referentes a linearidade, repetibilidade, recuperação e precisão intermediária, assim como os limites de detecção e quantificação também se apresentaram adequados para a quantificação dos compostos. O estudo também mostrou que a técnica GC-MS-SIM pode ser usada para analisar estes compostos em outras matrizes.

Informações sobre métodos já empregados para análise de compostos carbonílicos em diferentes tipos de bebidas encontram-se agrupadas algumas na Tabela 3.

Tabela 3-Métodos empregados para a determinação de CC em diferentes tipos de bebidas.

Matriz	CC analisados	Extração/pré-concentração	Agente derivatizante	Técnica instrumental	LD	Faixa de concentração	Referências
Aguardente de cana	Furfural Acroleína	Acetonitrila	2,4-DPNH	HPLC	0,02758mg/100mL	(4,28 a 39,78) mg/100mL (ND a 7,45) mg/100mL	(ZACARONI et al. 2011)
Aguardente de cana	Acroleína	Acetonitrila/metanol	2,4-DNPH	HPLC	0.0516mg/100 mL	(0 a 25,95) mg/100mL	(MASSON et al. 2012)
Cerveja	Formaldeído	Acetonitrila	2,4-DNPH	HPLC-UV	0,6ng/mL	(172 a 385) ng mL ⁻¹	(WANG et al., ,2012)
Vinho Branco	Acetaldeído	Acetonitrila	2,4- DNPH	HPLC-DAD/MS	5, µg L ⁻¹	(30 a70) mg L ⁻¹	(HAN et al., 2015)
Vinho Tinto						(4 a 6) mg L ⁻¹	
Cerveja	Formaldeído	Acetonitrila	Cloridrato de etoxiamina (EAHC)	HPLC-DAD	0,016 mg L ⁻¹	0,17 a 0,62) mg L ⁻¹	(ZHAO et al. 2016)
Cerveja	Furfural	Acetonitrila	2,4 DNPH	HPLC-DAD	19 µg L ⁻¹	(205 a 687) µg L ⁻¹	(RICO-YUSTE et al., 2016)
Vinho	Formaldeído Acetaldeído Acroleína, Furfural	HS-SPME	2,2,2-trifluoretilhidrazina (TFEH)	GC-MS	0,5 µg L ⁻¹ 3,0 µg L ⁻¹ 1,0 µg L ⁻¹ 1,1 µg L ⁻¹	(23,4 a 206) µg L ⁻¹ (51,5 a 635) µg L ⁻¹ (8,4 a 410) µg L ⁻¹ (83,99 a 1715) µg L ⁻¹	(LAGO et al., 2017)
Cerveja	Acetaldeído Acroleína, Formaldeído Furfural	HS-SPME	2,2,2-trifluoretilhidrazina (TFEH)	GC-MS-SIM	0,03 µg L ⁻¹ 0,3 µg L ⁻¹ 0,3 µg L ⁻¹ 0,1 µg L ⁻¹	(1,3 a 1,63) µg L ⁻¹ (0,3 e 2,5) µg L ⁻¹ (0,3 e 1,0) µg L ⁻¹ (0,1 e 1,0) µg L ⁻¹	(HERNANDES et al. 2019),
Água mineral	Formaldeído Acetaldeído	Acetonitrila	2,4-DPNH	LC-MS/MS	-	(2,6 a 31,4) µg mL ⁻¹ (5,3 a 144) µg mL ⁻¹	(ABE et al.,2021)
Água mineral	Formaldeído Acetaldeído Acroleína, Acetona, Propionaldeído, Crotonaldeído, Metacroleína, Isobutiraldeído, Butiraldeído, Valeraldeído, Hexaldeído, Benzaldeído, <i>o</i> -tolualdeído e <i>m</i> -tolualdeído	Acetonitrila	2,4-DPNH	LC-MS	(0,6 a 4,0) µg mL ⁻¹	(0 µg.mL ⁻¹ ,07 a 125) µg mL ⁻¹	(CARDOZO et al., 2021).

É possível também observar que os compostos majoritariamente analisados são de baixa massa molecular, com destaque para formaldeído, acetaldeído e acroleína. Poucos estudos, demonstraram a análise de compostos carbonílicos de massas moleculares maiores. Vale ressaltar que nenhum dos estudos contempla a análise de compostos carbonílicos ligados, podendo haver uma subestimação da concentração dos compostos carbonílicos em diferentes bebidas, uma vez que estas substâncias podem estar associadas ou ligadas a outros constituintes presentes nas matrizes analisadas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e padrões

- Padrões analíticos dos compostos carbonílicos, sob a forma de suas respectivas hidrazonas: formaldeído-2,4-DNPHo; acetaldeído-2,4-DNPHo; acroleína-2,4-DNPHo; propionaldeído-2,4-DNPHo; crotonaldeído-2,4-DNPHo; metacroleína-2,4-DNPHo; butiraldeído-2,4-DNPHo; benzaldeído-2,4-DNPHo; valeraldeído-2,4-DNPHo; cicloexanona-2,4-DNPHo; hexaldeído-2,4-DNPHo; heptanal-2,4-DNPHo; octanal-2,4-DNPHo; nonanal-2,4-DNPHo; decanal-2,4-DNPHo
- 2,4-Dinitrofenilidrazina (2,4-DNPH; pureza 97% - Sigma Aldrich);
- Ácido fosfórico (Vetec);
- Hidróxido de sódio (Dinâmica);
- Diclorometano (grau Pesticida - Merck);
- Acetonitrila (grau HPLC – J.T. Backer);
- Água ultrapura;
- Ácido clorídrico

3.2 Equipamentos e materiais

- Balança analítica
- Placa aquecedora;
- Bomba de vácuo;
- Banho de ultrassom;
- Ultrapurificador de água;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu);
- Medidor de pH (Digimed);
- Micropipetas de volumes variáveis;
- Sistema de filtração a vácuo;
- Filtros para seringa de PTFE (0,45 µm);
- Seringas de 5 e 10 mL (plástica ou vidro)
- Cartucho C18 (Sep-Pak, P/N: WAT051910);
- Vial de 2 mL, com tampa rosqueável e septos faceado com teflon;

- Papel de filtro qualitativo;
- Vidrarias: proveta de vidro (100mL), béquer de vidro (250mL), balão volumétrico (5 e 100 mL), Kitassato (500mL), funil de Büchner (5cm-D), Erlenmeyer (250mL), dessecador, vidro de relógio.

3.3 Soluções-padrão dos compostos carbonílicos

A solução multiparâmetro, contendo 15 compostos carbonílicos, numa concentração de 10 mg L⁻¹, foi preparada por diluição em acetonitrila, a partir das soluções padrões de hidrazonas dos compostos carbonílicos (CC) individuais. A solução preparada foi transferida para um frasco âmbar devidamente identificado e acondicionado sob refrigeração, para uso posterior. As concentrações de partida dos padrões estão apresentadas na Tabela 4.

Neste capítulo, deve-se descrever qual o método empregado para atingir os objetivos e quais materiais foram necessários.

Tabela 4-Concentração dos padrões individuais de hidrazonas dos compostos carbonílicos, em acetonitrila.

Hidrazonas de CC	Concentração (mg L ⁻¹)
Formaldeído-2,4-DNPHo	510
Acetaldeído-2,4-DNPHo	511
Acroleína-2,4-DNPHo	480
Propionaldeído-2,4-DNPHo	410
Crotonaldeído-2,4-DNPHo	400
Metacroleína-2,4-DNPHo	510
Butiraldeído-2,4-DNPHo	400
Benzaldeído-2,4-DNPHo	400
Valeraldeído-2,4-DNPHo	444
Cicloexanona-2,4-DNPHo	410
Hexaldeído-2,4-DNPHo	510
Hepetanal-2,4-DNPHo	400
Octanal-2,4-DNPHo	410
Nonanal-2,4-DNPHo	500
Decanal-2,4-DNPHo	444

Fonte: a própria autora

A partir da solução estoque (10 mg L^{-1}), preparada com a mistura dos compostos carbonílicos, foi preparada uma solução intermediária com concentração de $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Após o preparo a solução intermediária foi transferida para um frasco âmbar devidamente identificado e acondicionada sob refrigeração.

Para a quantificação dos compostos carbonílicos, foram construídas curvas analíticas por meio de diluições sucessivas da solução intermediária, nas concentrações de 5,0; 10; 25; 50; 100; 200; 300; 400 e $500 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para todos os analitos.

3.4 Solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH)

A solução de 2,4-DNPH, usada para a derivatização das amostras, foi preparada a partir do sólido recristalizado com base na descrição de CARDOZO et al. (2020). Para a recristalização da 2,4-DNPH, uma solução a 25% de acetonitrila (ACN) em água ultrapura foi preparada. 150 mL da solução foi transferida para um Erlenmeyer (250mL) e colocada no aquecimento a cerca de 260°C . Cerca de 1,5 g do reagente 2,4-DNPH recristalizado foi pesada e adicionada à solução ACN: água, lentamente e sob agitação, mantida no aquecimento até dissolução total do sólido. Após dissolução, foi realizada uma filtração a quente, à vácuo, da mistura para um Kitassato contendo 50 mL da solução ACN: água. O filtrado foi então transferido para um béquer e mantido no aquecimento para redução do volume até 100 mL. Após redução do volume, o béquer contendo o filtrado foi fechado com papel filme e armazenado em dessecador até ocorrer a cristalização (mínimo de 12h). O sólido recristalizado foi, então, filtrado à vácuo e mantido no dessecador até seu uso. A solução de 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) a 0,5% foi preparada conforme CARDOZO et al. (2021). Uma massa correspondente a concentração de trabalho (0,5%) do reagente sólido 2,4-DNPH recristalizado foi pesada e dissolvida em uma solução água: acetonitrila: ácido fosfórico P.A (60:39:1) até a dissolução total do sólido. A solução preparada foi purificada numa extração líquido-líquido usando diclorometano (15 a 20mL) para separação das fases. A fase aquosa da solução foi descartada e fase orgânica contendo 2,4-DNPH foi transferida para um frasco âmbar e armazenada sob refrigeração até o momento do uso. Um esquema das etapas de preparo da solução de 2,4-DNPH 0,5% está apresentado na Figura 5.

Figura 5- Etapas de preparo da solução de 2,4-DNPH.



Fonte: a própria autora

3.5 Obtenção e preparo das Amostras

Um total de 13 amostras de cervejas artesanais foram adquiridas em estabelecimentos comerciais localizados na cidade Salvador, Bahia, Brasil. Na escolha das amostras foram adotados os seguintes critérios: diferentes marcas, estilos e a disponibilidade no comércio. Algumas informações acerca das amostras utilizadas neste estudo encontram-se na Tabela 5.

Tabela 5-Informações das cervejas artesanais estudadas.

Amostras	Estilo / Tipo de Cerveja	Adjuntos / ingredientes	Origem
01	Witbeer	Coentro, pimenta da Jamaica e laranja	Bélgica
02	Premium Lager	Herbal	Jamaica
03	Larger	Trigo	Rio G. do Sul-Brasil
04	Weiss	Gengibre	Rio G. do Sul -Brasil
05	Pilsen	Trigo	Rio Negro - Argentina
06	Amber larger	Caramelo	Rio Negro - Argentina
07	Weiss	Laranja e coentro	Rio Negro - Argentina
08	Honey wheat ale	Mel de abelha	São Paulo - Brasil
09	American Lager	Laranja	São Paulo - Brasil
10	American índia pale ale	Maracujá	São Paulo - Brasil
11	Ale fruitbeer	Canela e frutas vermelhas	São Paulo - Brasil
12	Weissbeer	Cravo e banana	São Paulo - Brasil
13	Pilsen	Cereais frutados	São Paulo - Brasil

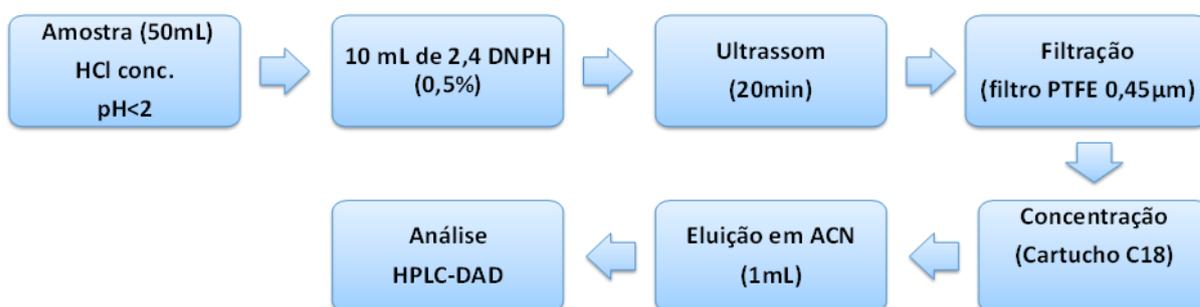
Fonte: a própria autora

Todas as amostras de cervejas artesanais foram submetidas ao processo de decarbonatação, conforme IAL (2008), para a remoção do CO₂, antes de serem submetidas ao procedimento de derivatização dos compostos carbonílicos. Após a decarbonatação as amostras foram mantidas fechadas e armazenadas sob refrigeração (4±2°C), nas embalagens originais até o momento das análises.

3.6 Análise dos Compostos Carbonílicos Livres

O procedimento utilizado por CARDOZO et al. (2021) para analisar compostos carbonílicos em água mineral foi adaptado e aplicado para quantificar compostos carbonílicos em amostras de cervejas artesanais. 50 mL de amostra de cerveja foram transferidos para um erlenmeyer de vidro (125 mL). 5 gotas de ácido clorídrico foram então adicionadas em cada uma das amostras para redução do pH até <2 . Em seguida 10 mL de solução de 2,4-DNPH a 0,5% foram adicionados e a mistura foi submetida ao banho de ultrassom por 20 min. Após a derivatização as amostras foram concentradas em cartuchos C18, previamente acondicionados com 2 mL de metanol. Um filtro de PTFE (0,45 μc) foi conectado numa das extremidades do cartucho e os compostos carbonílicos retidos nos cartuchos foram eluídos com 1 mL de acetonitrila (grau HPLC) e filtrados diretamente para o vial de 2,0 mL e injetados no sistema cromatográfico. A reação química que mostra a derivatização dos compostos carbonílicos nas amostras de cervejas artesanais está apresentada na Figura 4. Um esquema do procedimento descrito anteriormente está apresentado na Figura 6.

Figura 6-Análise de Compostos carbonílicos livres – derivatização.



Fonte: a própria autora

3.7 Análise dos Compostos Carbonílicos Ligados

O procedimento para a determinação dos compostos carbonílicos ligados foi adaptado de CARDOZO et al. (2020). Inicialmente, o pH das amostras foi ajustado até pH 11 para possibilitar a hidrólise dos compostos carbonílicos possivelmente ligados à substâncias presentes nas amostras de cervejas artesanais. Para isso cerca de 12 gotas de hidróxido de sódio 1 mol.L^{-1} foram adicionadas em 50 mL de cerveja artesanal e agitadas por 30 minutos. Após a agitação, 10 mL da solução de 2,4-DNPH 0,5% foram adicionados às amostras e estas foram submetidas ao banho de ultrassom por 20 minutos. Depois de derivatizadas, as amostras foram percoladas em cartuchos C 18, previamente acondicionados com 2 mL de metanol, para concentração dos analitos. Um filtro de PTFE (0,45 μc) foi conectado numa das extremidades do cartucho e os

compostos carbonílicos retidos nos cartuchos foram eluídos com 1 mL de acetonitrila (grau HPLC), e filtrados diretamente para o vial de 2,0 mL e injetados no sistema cromatográfico. Um esquema do procedimento descrito está apresentado na Figura 7.

Figura 7-Análise de Compostos carbonílicos ligados – derivatização.



Fonte: a própria autora

Os compostos carbonílicos ligados analisados de maneira indireta, por meio da quantificação dos compostos carbonílicos livres (CC_{livres}) e dos compostos carbonílicos totais (CC_{totais}), nas amostras de cervejas artesanais. A concentração dos CC_{ligados} foi obtida pela diferença entre as concentrações dos CC_{total} e CC_{livres} conforme a expressão abaixo.

$$CC_{\text{total}} - CC_{\text{livres}} = CC_{\text{ligados}}$$

3.8 Condições cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD), da marca Shimadzu, equipado com uma bomba quaternária (LC-20AT); comunicador (CBM-20A); injetor (SIL-20A); detector (SPD-M20A) e forno para coluna (CTO-20A). A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna C18 da marca Shimadzu (250 mm x 4,6mm), acoplada à uma pré-coluna C18 da marca Hexis (12,6mm x 4,6mm). A temperatura do forno foi 40°C. Foram usadas como fase móvel os solventes água (solvente A) e acetonitrila (solvente B). O gradiente de eluição foi: 0 - 2,0 min (45% B a 75% B); 2,0 - 10,0 min (75% B); 10,0 - 23,0 min (75% B a 100% B); 23,0 - 25,0 min (100% B); 25,0 - 27,0 min (100% B a 50% B); 27,0 - 33,0 min (50% B a 45% B); 33,0 - 33,5 min (45% B). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min. O volume de injeção para as soluções-padrão e para as amostras foi de 20 µL. As corridas cromatográficas foram realizadas em comprimento de onda de 365 nm. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. Vale ressaltar que as condições cromatográficas aqui definidas foram adaptadas de CARDOZO et al. (2021).

3.9 Validação do método

A validação de um método é essencial para a garantia da qualidade dos dados analíticos. É definida como sendo a confirmação e fornecimento por meio de análises e de evidência objetiva de que os requisitos específicos para uma determinada aplicação são atendidos (INMETRO, 2020).

Para avaliar o desempenho do método proposto foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: Seletividade, linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), repetibilidade (precisão intradia) e precisão intermediária (precisão interdia) (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002); (INMETRO, 2020).

3.9.1 Seletividade

Em um método de separação, a seletividade mede a capacidade do método em quantificar e avaliar o analito de interesse na presença de outros componentes que possam interferir na sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade permite distinguir o composto em estudo dos demais que possam estar presentes na amostra. Este parâmetro pode ser avaliado por diversas formas: através da comparação da matriz isenta do analito de interesse com uma matriz adicionada; avaliação com detectores comparando-se o espectro do pico obtido na separação (amostra) com o pico de um padrão, onde esta informação é utilizada como indicação do composto puro; adição padrão, onde uma curva analítica com adição da substância de interesse na amostra é comparada com uma curva analítica sem a presença da matriz. (RIBANI et al., 2004). Neste trabalho a seletividade foi avaliada comparando os resultados da matriz isenta com a matriz adicionada com o padrão dos compostos carbonílicos em estudo.

3.9.2 Linearidade

A linearidade está relacionada a capacidade de um procedimento analítico em gerar resultados cuja resposta é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra analisada. Pode ser avaliada por meio do gráfico da curva analítica e do coeficiente de determinação (R^2). Um mínimo de cinco pontos em níveis de concentração diferentes deve ser utilizado para construção da curva analítica. Matematicamente, a linearidade é representada pela expressão $y = bx + a$. Onde, y = resposta do instrumento; x = concentração; b = coeficiente angular (inclinação da curva) e a = coeficiente linear (interseção com o eixo Y) (INMETRO, 2020).

No método proposto, nove níveis de concentração 5,0; 10; 25; 50; 100; 200; 300; 400 e

500 $\mu\text{g L}^{-1}$ (definidos após avaliação qualitativa de duas amostras de cervejas), foram analisados. Com os dados obtidos foram construídos os gráficos das curvas analíticas utilizando as médias das áreas dos picos (eixo Y) em função da concentração correspondente (eixo X), para cada um dos compostos carbonílicos analisados.

3.9.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) de um método é a menor quantidade de analito que pode ser detectada na amostra, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio. O limite de quantificação (LQ) de um método é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis. Estes parâmetros podem ser calculados de três formas: método visual, método da relação sinal-ruído ou pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (INMETRO, 2020). No método proposto, os limites de detecção e os limites de quantificação foram calculados através dos parâmetros das curvas analíticas.

O LD foi obtido multiplicando três vezes a razão entre o erro padrão da intersecção e o coeficiente da variável X. O LQ foi calculado multiplicando dez vezes a razão entre o erro padrão da intersecção e o coeficiente da variável X (INMETRO, 2020). As representações matemáticas para o LD e o LQ estão apresentadas nas expressões 1 e 2.

$$\text{LD} = 3 \times \frac{s}{S} \quad (1)$$

$$\text{LQ} = 10 \times \frac{s}{S} \quad (2)$$

Onde (s) é o erro padrão da intersecção e (S) é o coeficiente da variável X.

3.9.4 Precisão

A precisão avalia o grau de proximidade entre os resultados de testes obtidos em condições definidas para uma série de medidas (THOMSON et al, 2002). Pode ser obtida em diferentes níveis: repetibilidade (precisão intradia), precisão intermediária (precisão interdia) e reprodutibilidade. A repetibilidade e a precisão intermediária foram os parâmetros avaliados neste trabalho e os níveis de concentração testados foram 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$. A fórmula matemática usada no cálculo está apresentada na expressão 3 abaixo.

$$\text{RSD}\% = \frac{SD}{\text{média}} \times 100 \quad (3)$$

Onde (SD) é o desvio padrão das medidas

A repetibilidade foi testada injetando, para cada nível de concentração, cinco soluções

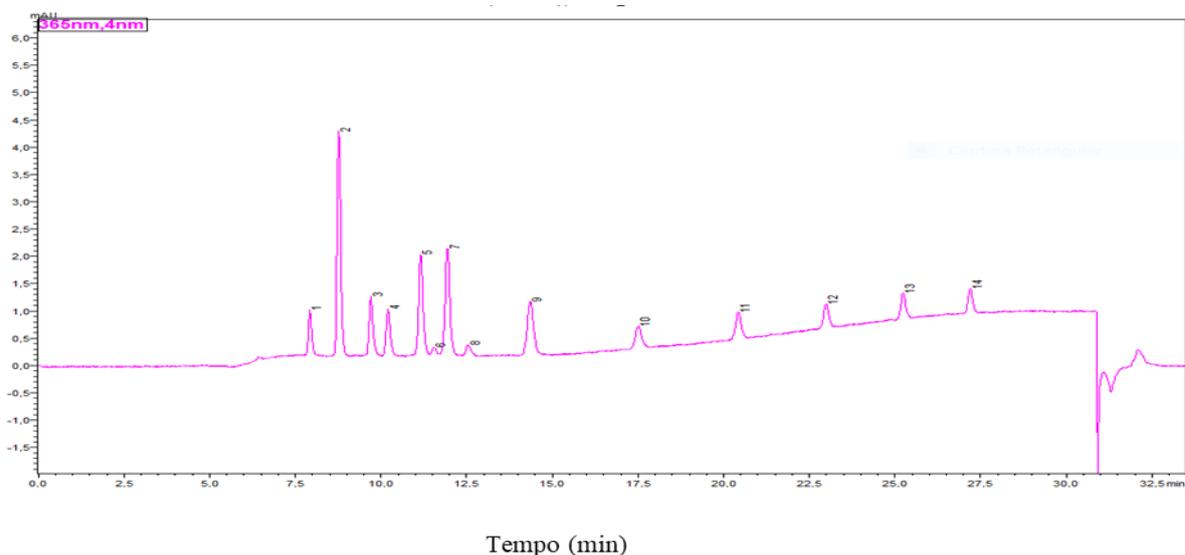
padrões de diferentes preparos, no mesmo dia. Para a precisão intermediária, soluções de cada nível de concentração foram preparadas uma única vez e injetadas em dias diferentes, durante cinco dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Separação cromatográfica

A separação cromatográfica mostrou-se satisfatória para os compostos analisados. O cromatograma apresentado (Figura 4) é resultado da injeção de uma solução padrão de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ contendo os quinze compostos estudados. Contudo, somente quatorze picos foram identificados. A diferença evidenciada é devida não separação dos compostos valeraldeído e ciclohexanona em função do efeito de coeluição. Estes compostos, quando analisados individualmente, apresentaram tempos de retenção muito próximos (14,127min e 13,974min respectivamente) o que pode ter resultado na sobreposição dos picos durante a injeção simultânea. De modo a melhorar a eficiência da separação para estes compostos, uma sugestão seria aumentar o número de pratos teórico da coluna.

Figura 8- Cromatograma obtido, por HPLC-DAD, de uma mistura padrão de CC na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$, no comprimento de onda de 365nm. Identificação dos picos por n°: formaldeído (1); acetaldeído (2.); acroleína (3); propionaldeído (4); crotonaldeído (5); metacroleína (6); butiraldeído (7); benzaldeído (8); valeraldeído+ciclohexanona (9); hexaldeído (10); heptanal (11); octanal (12.); nonanal (13); decanal (14).



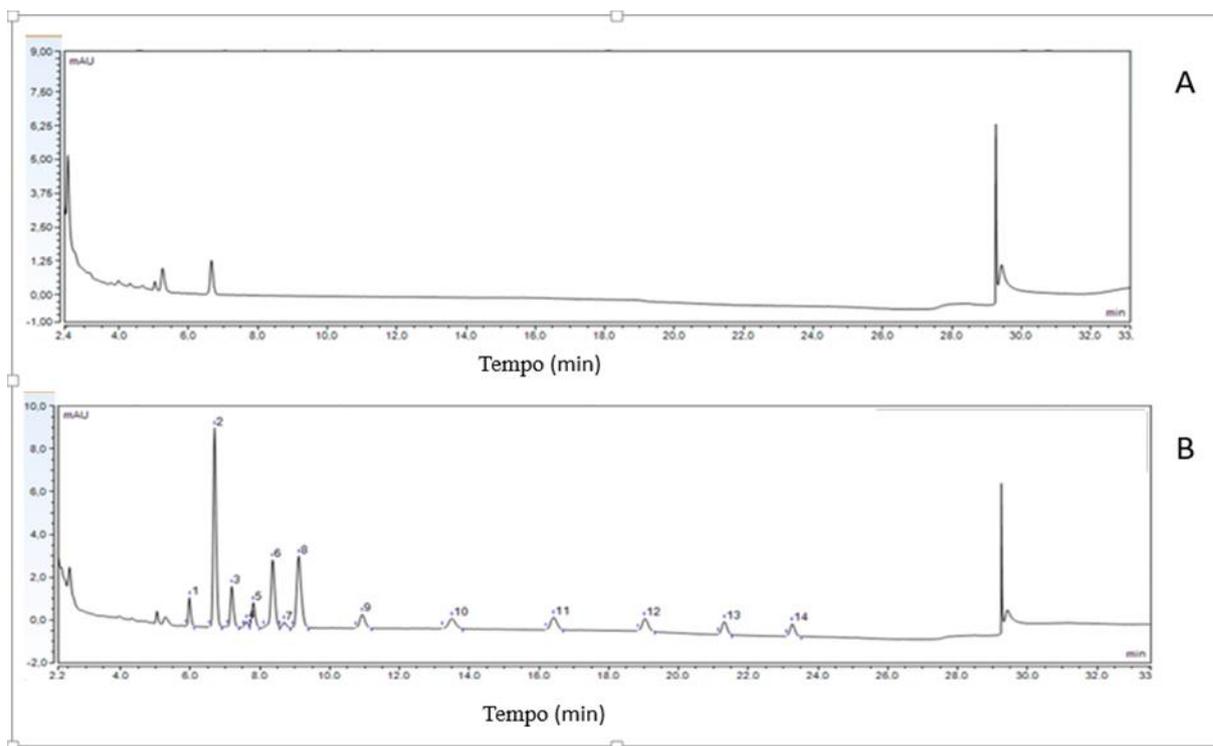
4.2 Validação do método

4.2.1 Seletividade

Nas condições cromatográficas empregadas foi possível observar que a amostra utilizada não apresentou espécies químicas interferentes nos tempos de retenção dos compostos carbonílicos estudados, conforme mostra os cromatogramas da Figura 9A (amostra isenta) e 9B (a mesma amostra fortificada com uma mistura dos padrões de CC numa concentração de

200 $\mu\text{g L}^{-1}$), demonstrando assim a seletividade do método para análise de compostos carbonílicos em cervejas artesanais.

Figura 9 - Cromatograma obtido, por HPLC, de uma amostra de (A) uma amostra de cerveja artesanal isenta e (B) da mesma amostra com adição dos padrões de CC numa concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, no comprimento de onda de 365 nm, para certificação da seletividade. Identificação dos picos por n°: formaldeído (1); acetaldeído (2.); acroleína (3); propionaldeído (4); crotonaldeído (5); metacroleína (6); butiraldeído (7); benzaldeído (8); valeraldeído+ciclohexanona (9); hexaldeído (10); heptanal (11); octanal (12.); nonanal (13); decanal (14).



4.2.2 Linearidade

Após análises dos dados foi possível observar que o método proposto apresentou boa linearidade para os níveis de concentração: 5 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a acroleína; 25 a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ para metacroleína; 10 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para benzaldeído e 5 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os demais compostos. Estes intervalos apresentaram as melhores respostas em relação aos coeficientes de determinação (R^2), cujos valores obtidos variaram de 0,9990 a 0,9999. Estes valores indicam uma boa dispersão dos pontos e um ajuste ideal dos dados à linha de regressão, uma vez que, os valores de R^2 se mantiveram maiores que 0,99 conforme recomenda a literatura (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002; RIBANI et al., 2004). As equações das curvas analíticas, os coeficientes de determinação (R^2) e as faixas de trabalho estão apresentados na Tabela 6. As curvas analíticas para cada composto carbonílico estão apresentados no Anexo I.

Tabela 6 - Equação das curvas analítica, valores de (R^2) e faixa de trabalho do CC analisados.

Compostos	Equação da curva	R^2	Faixa de trabalho ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Formaldeído	$Y = 83,949x - 179,2$	0,9996	5 a 200
Acetaldeído	$Y = 517,8x + 129,75$	0,9997	5 a 200
Acroleína	$Y = 157,35x - 312,99$	0,9994	5 a 100
Propionaldeído	$Y = 125,26x - 59,639$	0,9996	5 a 200
Crotonaldeído	$Y = 297,68x - 262,33$	0,9997	5 a 200
Metacroleína	$Y = 23,897x - 141,17$	0,9996	25 a 300
Butiraldeído	$Y = 348,36x - 417,71$	0,9996	5 a 200
Benzaldeído	$Y = 33,036x - 88,737$	0,9990	10 a 200
Valeraldeído + Cicloexanona	$Y = 225,86x - 366,73$	0,9995	5 a 200
Hexaldeído	$Y = 88,452x - 241,47$	0,9992	5 a 200
Heptanal	$Y = 99,07x - 78,497$	0,9991	5 a 200
Octanal	$Y = 84,199x - 218,25$	0,9999	5 a 200
Nonanal	$Y = 80,453x - 134,62$	0,9995	5 a 200
Decanal	$Y = 72,84x - 102,67$	0,9996	5 a 200

Fonte: a própria autora

4.2.3 Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Os valores encontrados para os limites de detecção variaram entre $1,69 \mu\text{g L}^{-1}$ (octanal) e $6,13 \mu\text{g L}^{-1}$ (metacroleína). Enquanto que para os limites de quantificação a variação foi de $5,62 \mu\text{g L}^{-1}$ (octanal) a $20,45 \mu\text{g L}^{-1}$ (metacroleína). Para os limites de detecção os valores encontrados no presente estudo foram menores quando comparados os valores de $16 \mu\text{g L}^{-1}$ (formaldeído) encontrados por ZHAO et al. (2016), considerando que a mesma técnica (HPLC-DAD), foi utilizada em ambos os trabalhos. Os valores individuais para os limites de detecção e os limites quantificação estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7-Limites de detecção e limites de quantificação para os compostos carbonílicos.

Compostos	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Formaldeído	2,90	9,66
Acetaldeído	2,37	7,89
Acroleína	2,11	7,02
Propionaldeído	2,93	9,68
Crotonaldeído	2,58	8,61
Metacroleína	6,13	20,45
Butiraldeído	2,68	8,94
Benzaldeído	5,52	18,39
Valeraldeído + Cicloexanona	3,08	10,26
Hexaldeído	3,99	13,29
Heptanal	4,12	13,74
Octanal	1,69	5,62
Nonanal	3,28	10,94
Decanal	2,91	9,71

Fonte: a própria autora

4.2.4 Precisão

Na precisão intradia (repetibilidade) os valores de desvios padrão relativos encontrados estiveram entre 1,13 % (crotonaldeído) na concentração de 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 16,9% (metacroleína) na concentração 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Na precisão interdia (precisão intermediária), os valores variaram entre 0,35 % (butiraldeído) na concentração 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 16,9% (hexaldeído) na concentração 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para estes parâmetros, o critério de aceitação para o desvio padrão relativo (RSD) pode ser de 1 a 2% para quantificação de macro quantidades e de até 20% para análise de traços (RIBANI et al, 2004).

Neste trabalho o as determinações foram a níveis de traços de concentração sendo, portanto, considerado o critério de 20%. Todos os resultados obtidos, para ambos os testes, estiveram abaixo de 20% para todos os níveis de concentração testados, demonstrando que os resultados de precisão para o método proposto foram satisfatórios. Os valores obtidos para a repetibilidade e precisão intermediária, estão apresentados nas Tabelas 8 e 9, respectivamente.

Tabela 8 – Medida das áreas dos picos e do desvio padrão relativo (RSD%) obtidos para cada composto carbonílico na precisão Intradia (repetibilidade).

Composto	5 $\mu\text{g L}^{-1}$		25 $\mu\text{g L}^{-1}$		50 $\mu\text{g L}^{-1}$		200 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Área	RSD (%)	Área	RSD (%)	Área	RSD (%)	Área	RSD (%)
Formaldeído	509	12,7	2150	12,6	4478	13,8	17104	4,03
Acetaldeído	2706	2,63	12835	4,45	26530	4,41	99693	2,04
Acroleína	748	11,6	3869	3,29	7867	3,47	30362	2,06
Propionaldeído	626	14,2	3 202	2,86	6388	4,94	24479	2,14
Crotonaldeído	1463	9,07	7475	1,67	15362	1,74	59226	1,13
Meta acroleína	--	--	311	16,9	1190	4,93	4544	2,97
Butiraldeído	1636	9,28	8451	3,78	17862	3,29	68147	1,72
Benzaldeído	--	--	825	13,0	1569	6,78	6305	2,78
Valeraldeído + Ciclo Hexanona	1189	10,5	5395	4,6	11332	2,74	44379	1,86
Hexaldeído	525	12,9	1852	12,2	4264	4,59	17258	2,18
Heptanal	495	16,5	2252	6,4	5017	5,21	19399	2,02
Octanal	475	15,0	1957	6,35	4296	6,19	16543	1,59
Nonanal	381	15,5	1960	7,36	4092	5,74	15684	1,91
Decanal	400	12,1	1804	6,60	3809	3,42	14265	2,00

Fonte: a própria autora

Tabela 9 - Áreas dos picos e desvio padrão relativo (RSD%) obtidos para cada composto carbonílico na precisão Interdiária (precisão intermediária).

Composto	5 µg L ⁻¹		25 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹		200 µg L ⁻¹	
	Área	RSD (%)	Área	RSD (%)	Área	RSD (%)	Área	RSD (%)
Formaldeído	--	--	1795	6,83	4110	3,91	17031	4,09
Acetaldeído	2577	2,56	12068	1,34	26469	0,68	101984	0,67
Acroleína	605	10,1	3407	4,14	7503	1,3	30660	0,44
Propionaldeído	573	8,97	2796	4,77	6019	1,9	24854	0,48
Crotonaldeído	1271	7,28	6614	1,6	14433	1,23	59910	0,95
Meta acroleína	--	--	276	14,5	1121	8,26	4588	2,08
Butiraldeído	1455	7,94	7440	4,02	16745	1,71	69297	0,35
Benzaldeído	--	--	631	11,6	1472	10,2	6534	1,42
Valeraldeído + Ciclo Hexanona	1027	7,82	4802	3,69	10791	1,73	45001	0,66
Hexaldeído	396	16,8	1687	16,9	4079	3,32	17432	1,21
Heptanal	374	13,7	1931	10,9	4675	3,47	19654	0,94
Octanal	321	7,67	1612	8,08	3931	3,73	16817	0,97
Nonanal	370	14,1	1608	5,74	3876	3,33	15860	1,04
Decanal	328	11,2	1505	7,34	3419	3,75	14469	0,96

Fonte: a própria autora

4.3 Análises dos compostos carbonílicos livres e ligados em amostras reais de cervejas artesanais

Os resultados obtidos para os compostos carbonílicos (CC) livres e ligados nas amostras de cervejas artesanais analisadas estão apresentados na Tabela 10.

As concentrações dos compostos carbonílicos livres variaram de 7,30 µg L⁻¹ (acroleína – amostra 01) a 2896,97 µg L⁻¹ (acroleína – amostra 10). Para os ligados a variação foi de 11,20 µg L⁻¹ (octanal – amostra 10) a 2270,05 µg L⁻¹ (propionaldeído – amostra 12).

Um dos compostos mais estudados em bebidas tem sido o acetaldeído (Tabela 3). Neste trabalho, o analito citado foi quantificado em 92% das amostras analisadas. Em 69% das amostras a fração de acetaldeído ligado foi maior em relação a fração de acetaldeído livre. CARDOZO et al. (2020), analisando compostos carbonílicos em amostras de material particulado atmosférico também encontraram concentrações de acetaldeído ligado (211 µg g⁻¹) maiores do que as concentrações de acetaldeído livre (28 µg g⁻¹), mostrando que este composto pode estar associado a outras substâncias em diferentes tipos de matrizes.

Das treze amostras analisadas, em apenas uma, a concentração de acetaldeído foi <LD

para a fração livre e <LQ para a fração ligada. Para as demais amostras as concentrações variaram de 22,47 $\mu\text{g/L}^{-1}$ a 1665,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ (fração ligada) e de 8,83 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 466,09 $\mu\text{g L}^{-1}$ (fração livre).

Os dados também mostraram que outros compostos de maior relevância encontrados nas amostras de cervejas artesanais foram formaldeído (livre: <LD a 15,77 $\mu\text{g L}^{-1}$; ligado: <LD a 97,73 $\mu\text{g L}^{-1}$) e acroleína (livre: ND a 2896,97 $\mu\text{g L}^{-1}$; ligado: ND a 713,41 $\mu\text{g L}^{-1}$).

No estudo realizado por ZHAO et al., (2016), em amostras de cervejas as concentrações encontradas para formaldeído (livre) variaram entre 170 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 620 $\mu\text{g L}^{-1}$, ao passo que YANG et al., (2016) observaram que as concentrações para este mesmo composto variaram de 172 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 385 $\mu\text{g L}^{-1}$.

HERNADES et al., (2019) também analisaram CC livres em cervejas e alguns dos compostos mais relevantes encontrados nas bebidas foram: acetaldeído (1,30 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 1,63 $\mu\text{g L}^{-1}$), acroleína (0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$) e formaldeído (0,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 1,0 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Compostos carbonílicos de maiores massas moleculares identificados nas amostras de cerveja artesanais, com maior frequência analítica e suas respectivas concentrações nas formas livres e ligadas foram: crotonaldeído (livre: 173,59 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 199, 50 $\mu\text{g L}^{-1}$; ligado: 333,87 a 463,99 $\mu\text{g L}^{-1}$); benzaldeído (livre: inferiores a 10,33 $\mu\text{g L}^{-1}$; ligado: 125,66 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 1326,45 $\mu\text{g L}^{-1}$); hexaldeído (livre: 113,77 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 364,85 $\mu\text{g L}^{-1}$; ligado: inferiores a 19,93 $\mu\text{g L}^{-1}$); heptanal (livre: 72,51 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 1140,03 $\mu\text{g L}^{-1}$; ligado: inferiores ao LQ); octanal (livre: 561,62 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 564,55 $\mu\text{g L}^{-1}$; ligado: 11,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 18,99 $\mu\text{g L}^{-1}$). Vale ressaltar que na literatura não têm sido analisados compostos carbonílicos de maiores massas moleculares em amostras de cervejas e, conseqüentemente, estas substâncias não têm sido avaliadas nas suas formas livres e ligadas na bebida.

Os valores obtidos para os CC nas amostras analisadas confirmaram a previsão de que poderiam existir frações destas espécies na forma livre e ligada a outras substâncias presentes na cerveja artesanal.

Tabela 10 - Concentração de CC livres e ligados nas amostras de cervejas artesanais.

Composto	AMOSTRA 01		AMOSTRA 02		AMOSTRA 03		AMOSTRA 04		AMOSTRA 05	
	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado
Formaldeído	<LD	32,72 \pm 0,95	15,77 \pm 0,24	<LQ	<LQ	28,69 \pm 3,07	<LD	83,84 \pm 1,30	<LD	19,00 \pm 0,14
Acetaldeído	459,9 \pm 11,30	165,72 \pm 3,5	8,83 \pm 0,56	22,47 \pm 4,68	34,04 \pm 0,95	142,90 \pm 0,05	83,93 \pm 0,64	44,70 \pm 0,26	142,11 \pm 3,97	1665,05 \pm 8,79
Acroleína	2896,97 \pm 10,59	<LQ	2152,79 \pm 18,61	713,41 \pm 52,33	1400,33 \pm 1040,99	ND	2022,06 \pm 25,32	ND	<LQ	12,09 \pm 0,58
Propilnaldeído	ND	<LQ	ND	ND	ND	<LQ	ND	ND	1182,10 \pm 28,27	ND
Crotonaldeído	ND	ND	173,59 \pm 7,98	463,99 \pm 20,91	<LQ	ND	199,50 \pm 23,78	ND	ND	<LD
Meta acroleína	ND	ND	128,37 \pm 12,55	ND	ND	<LD	ND	ND	ND	ND
Butiraldeído	ND	ND	ND	ND	ND	<LQ	ND	<LD	ND	25,54 \pm 0,26
Benzaldeído	ND	ND	ND	ND	<LQ	1326,45 \pm 22,87	10,33 \pm 2,07	1281,79 \pm 89,57	<LD	158,66 \pm 5,23
Valeraldeído + Ciclo Hexanona	12,11 \pm 0,51	ND	<LD	<LD	ND	ND	ND	<LD	<LD	<LD
Hexaldeído	ND	<LD	ND	<LD	113,77 \pm 7,91	ND	364,85 \pm 4,47	ND	ND	<LD
Heptanal	1039,66 \pm 30,74	ND	1140,03 \pm 25,06	ND	445,39 \pm 7,90	ND	101,05 \pm 0,63	ND	ND	ND
Octanal	ND	ND	ND	18,99 \pm 3,89	ND	<LQ	ND	ND	ND	ND
Nonanal	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	55,70 \pm 12,50	<LQ	ND
Decanal	ND	<LD	ND	ND	ND	13,09 \pm 2,37	ND	<LQ	ND	ND

Fonte: a própria autora

Tabela 11 - Concentração de CC livres e ligados nas amostras de cervejas artesanais – Continuação.

Composto	AMOSTRA 06		AMOSTRA 07		AMOSTRA 08		AMOSTRA 09	
	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado
Formaldeído	<LD	14,02 \pm 0,06	<LQ	<LD	<LD	12,71 \pm 0,85	<LD	<LD
Acetaldeído	242,06 \pm 2,55	158,98 \pm 0,75	<LD	<LQ	252,54 \pm 5,76	814,85 \pm 40,92	69,43 \pm 1,31	303,06 \pm 10,99
Acroleína	2570,09 \pm 1,25	ND	<LD	<LD	<LD	<LQ	1415,75 \pm 27,89	ND
Propilnaldeído	ND	<LD	362,92 \pm 4,69	ND	925,69 \pm 10,10	ND	ND	<LD
Crotonaldeído	ND	<LD	ND	<LD	ND	333,87 \pm 12,71	148,15 \pm 6,11	ND
Meta acroleína	ND	ND	ND	1124,27 \pm 52,57	ND	ND	ND	ND
Butilraldeído	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benzaldeído	<LD	508,54 \pm 3,66	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Valeraldeído + Ciclo Hexanona	ND	<LD	ND	ND	<LD	<LD	<LD	<LD
Hexaldeído	165,18 \pm 1,40	ND	ND	ND	<LD	<LD	<LD	<LD
Heptanal	127,11 \pm 1,84	ND	ND	ND	<LD	<LD	72,51 \pm 5,43	ND
Octanal	<LD	<LD	ND	ND	<LQ	<LD	<LD	<LD
Nonanal	<LD	<LD	ND	<LD	222,11 \pm 33,05	ND	ND	ND
Decanal	<LD	<LQ	ND	<LD	ND	16,64 \pm 0,52	ND	ND

Fonte: a própria autora

Tabela 12 - Concentração de CC livres e ligados nas amostras de cervejas artesanais – Continuação.

Composto	AMOSTRA 10		AMOSTRA 11		AMOSTRA 12		AMOSTRA 13	
	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC livre	Conc. ($\mu\text{g L}^{-1}$) CC ligado
Formaldeído	<LD	<LQ	<LD	$19,28 \pm 0,76$	<LQ	$97,73 \pm 3,00$	<LD	<LQ
Acetaldeído	$466,09 \pm 10,10$	$675,32 \pm 0,62$	$141,98 \pm 5,09$	$1048,20 \pm 60,37$	$10,41 \pm 0,23$	$302,57 \pm 11,03$	$57,05 \pm 1,02$	$1303,08 \pm 0,30$
Acroleína	$7,30 \pm 0,26$	ND	$1316,45 \pm 36,92$	ND	$1811,68 \pm 43,52$	ND	$853,17 \pm 2,68$	ND
Propilnaldeído	$617,28 \pm 9,99$	ND	ND	<LD	ND	$2270,05 \pm 14,96$	ND	<LD
Crotonaldeído	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Meta acroleína	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Butiraldeído	<LD	<LD	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Benzaldeído	<LD	<LD	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Valeraldeído + Ciclo Hexanona	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD
Hexaldeído	<LD	<LQ	<LD	$19,93 \pm 0,78$	<LD	<LD	<LD	<LQ
Heptanal	ND	<LQ	ND	<LQ	<LD	<LD	<LQ	LQ
Octanal	ND	$11,20 \pm 1,36$	$561,62 \pm 27,38$	ND	ND	ND	$564,55 \pm 5,92$	ND
Nonanal	<LQ	<LD	ND	ND	ND	ND	ND	$18,03 \pm 0,16$
Decanal	ND	$22,34 \pm 1,99$	ND	ND	ND	ND	ND	$27,64 \pm 0,11$

Fonte: a própria autora

5 CONCLUSÃO

A separação cromatográfica do método proposto permitiu a identificação eficaz para treze dos quinze compostos carbonílicos analisados em cervejas artesanais.

Os dados da validação do método foram satisfatórios uma vez que foi possível atender os critérios exigidos pelos padrões de referências. Foi possível identificar e quantificar compostos carbonílicos livres e ligados em baixas concentrações (LD: $1,69 \mu\text{g L}^{-1}$ a $6,13 \mu\text{g L}^{-1}$ e LQ: $5,62 \mu\text{g L}^{-1}$ a $20,45 \mu\text{g L}^{-1}$) e com boa precisão (precisão intradia: 1,13 % a 16,9 % e precisão interdia: 0,35 % a 16,9 %).

Após aplicado o método nas amostras de cervejas artesanais foi constada a presença de compostos carbonílicos nas suas formas livres e ligados em concentrações que variaram de $7,30 \mu\text{g L}^{-1}$ a $2896,97 \mu\text{g L}^{-1}$ e de $11,20 \mu\text{g L}^{-1}$ a $2270,05 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Este estudo poderá contribuir de forma significativa para incentivar o aprofundamento do conhecimento acerca da formação dos compostos carbonílicos em cervejas artesanais, melhorando a qualidade do produto final. Além disso, afirma a necessidade e importância da inclusão destes na legislação que regulamenta os padrões de qualidade da bebida no Brasil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, Y.; KOBAYASHI, N.; YAMAGUCHI, M.; MUTSUGA, M.; OZAKI, A.; KISHI, E., SATO, K. **Determination of formaldehyde and acetaldehyde levels in poly (ethylene terephthalate) (PET) bottled mineral water using a simple and rapid analytical method.** Food Chemistry, v. 344, p. 128708, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128708>.
- AGUIAR JÚNIOR, CA, SILVA, N.; SOARES, DF; & FARIA, AM FARIA. **Extração em sólido de partículas de agrotóxicos de água superficial, empregando sorvente de fase menor.** Química Nova, v. 41, p. 641-647, 2018. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170223>.
- ANDERSON, H. E.; SANTOS, I. C.; HILDENBRAND, Z. L.; SCHUG, K. A. **A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control.** Analytica chimica acta, v. 1085, p. 1-20, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.061>.
- ANDRADE-EIROA, A.; CANLE, M.; LEROY-CANCELLIERI, V.; CERDÀ, V. **Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I).** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 80, p. 641-654, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>
- ANDRÉS-IGLESIAS, C.; NESPOR, J.; JARABIM, M.; MONTEIRO, O.; BLANCO, C. A. **Comparison of carbonyl profiles from Czech and Spanish lagers: Traditional and modern technology.** LWT-Food Science and Technology, v. 66, p. 390-397, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.066>.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Instrução Normativa – IN nº 65, de 10 de dezembro de 2019, estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria.** Diário Oficial da União. Brasília, DF, 11 de dezembro de 2019.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Anuário da Cerveja no Brasil 2020.** Brasília, 2021.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 65, de 29 de novembro de 2011, dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para fabricação de cervejas.** Diário Oficial da União.
- BRASIL. Presidência da República. Casa civil. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.** Diário Oficial da União, 04 de junho de 2009.
- CARDOZO, I. M. M.; SOUSA, E. T.; DA ROCHA, G. O.; DOS ANJOS, J. P.; DE ANDRADE, J. B. **Determination of free-and bound-carbonyl compounds in airborne particles by ultra-fast liquid chromatography coupled to mass spectrometry.** Talanta, v. 217, p. 121033, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121033>
- CARDOZO, I. M. M.; DOS ANJOS, J. P.; DA ROCHA, F. O. C.; DE ANDRADE, J. B. **Exploratory analysis of the presence of 14 carbonyl compounds in bottled mineral**

water in polyethylene terephthalate (PET) containers. Food Chemistry, p. 130475, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130475>.

CERVBRASIL-Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br>. Acesso em: 07 de março de 2021.

CERVESIA – Tecnologia Cervejeira. Disponível em: <https://www.cervesia.com.br>. Acesso em: 07 de março de 2021.

COELHO NETO, D. M.; FERREIRA, L. L. P.; SAD, C. M. S.; CASTRO, E. V. R.; BORGES; W. S.; FILGUEIRAS, P. R.; LACERDA JR, V. **Conceitos Químicos Envolvidos na Produção da Cerveja: Uma Revisão.** Revista Virtual de Química, v. 12, n. 1, p. 120⁻¹ 47, 2020. DOI: 10.21577/1984-6835.20200011.

DALLA SANTA, O. R.; ROSA, C. T.; DA SILVA, N. S. R.; MICHELETTI, I. N.; KRUGER, R. L.; MESOMO, M. C.; ZANETTE, C. M. **Estudo da adição de pitaya na produção de cerveja.** Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 10, p. 80891-80900, 2020. <https://doi.org/10.34117/bjdv6n10-493>.

DE LIMA, B.; PINTO, E. P.; BRAVO, C. E. C.; MARCHI, J. F. **Caracterização físico-química de cerveja Summer Ale adicionada de polpa de pitanga (Eugenia uniflora).** Brazilian Journal of Development, v. 7, n. 3, p. 25337-25343, 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-303>.

SANTOS, SÉRGIO DE PAULA. **Os primórdios da cerveja no Brasil. 1ª ed.** Cotia: Atelie Editorial, 2003.

FAGHERAZZI M. M.; RUFATO L. **Produzir lúpulo no Brasil, utopia ou realidade?** Revista Agronomia Brasileira, V.2, 2018. <https://doi: 10.29372/rab201803>.

FERNANDES, N. C. M.; GOMES, F. D. C. O.; GARCIA, C. F.; VIEIRA, M. D. L. A.; MACHADO, A. M. D. R. **Use of solid phase microextraction to identify volatile organic compounds in brazilian wines from different grape varieties.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 21, 2018. <https://doi.org/10.1590/1981-6723.05817>.

FERREIRA, A. C.; PEREIRA, M. M. O.; DE REZENDE, D. C.; VIEIRA, A. S. **Simbolismo e Construção da Identidade por meio do Consumo de Cerveja Artesanal.** Revista de Negócios, v. 23, n. 3, p. 19-35, 2018. <http://dx.doi.org/10.7867/1980-4431.2018v23n3p19-35>.

FERREIRA, A. C.; PEREIRA, M. M. O.; DE REZENDE, D. C.; VIEIRA, A. S. **Motivações de compra e hábitos de consumo: um estudo com apreciadores de cerveja artesanal.** Revista da Micro e Pequena Empresa, v. 13, n. 1, p. 12-31, 2019. <http://dx.doi.org/10.21714/19-82-25372019v13n1p1231>.

FERREIRA, D. C.; HERNANDES, K. C.; NICOLLI, K. P.; SOUZA-SILVA, É. A.; MANFROI, V.; ZINI, C. A.; WELKE, J. E. **Development of a method for determination of target toxic carbonyl compounds in must and wine using HS-SPME-GC/MS-SIM after preliminary GC× GC/TOFMS analyses.** Food Analytical Methods, v. 12, n. 1, p. 108⁻¹ 20, 2019a. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2018.01.006>.

- FERREIRA, D. C.; NICOLLI, K. P.; SOUZA-SILVA, É. A.; MANFROI, V.; ZINI, C. A.; e WELKE, J. E. **Carbonyl compounds in different stages of vinification and exposure risk assessment through Merlot wine consumption.** Food Additives & Contaminants: Part A, v. 35, n. 12, p. 2315-2331, 2018a. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1539530>.
- FREIRE, B. R. ; LEMES, D. S. ; MORAES, A. S. DA S. ; GRIS, E. F. ; CHAKER, J. A. ; ORSI, D. C. **Caracterização físico-química de cervejas artesanais de atemoia (*Annona cherimoia* Mill. X *Annona squamosa* L) e de sapoti (*Manilkara sapota* L.).** Agrarian, v. 13, n. 48, p. 280-287, 2020. DOI: 10.30612/agrarian.v13i48.9232.
- GIANNAKOU, K.; VISINONI, F.; ZHANG, P.; NATHOO, N.; JONES, P.; COTTERRELL, M.; DELNERI, D. **Biotechnological exploitation of *Saccharomyces jurei* and its hybrids in craft beer fermentation uncovers new aroma combinations.** Food Microbiology, v. 100, p. 103838, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103838>.
- GOMES, W. P. C.; YOSHINAGA, F.; BORTOLETO, G. G. **Determinação de álcoois em bebidas comerciais por cromatografia gasosa e amostragem por headspace.** Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171), v. 10, n. 1, p. 111⁻¹ 24, 2020.
- GOODMAN, M.; NEAL, J. A.; CORSI, A.; SIRSAT, S. A. **Isolation of Beer-Spoiling Bacteria from Texas Craft Breweries.** Journal of Culinary Science & Technology, v. 18, n. 2, p. 116⁻¹ 23, 2018. <https://doi.org/10.1080/15428052.2018.1509754>.
- HAN, G.; WANG, H.; WEBB, M. R.; WATERHOUSE, A. L. **A rapid, one step preparation for measuring selected free plus SO₂-bound wine carbonyls by HPLC-DAD/MS.** Talanta, v. 134, p. 596-602, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.046>.
- HERNANDES, K. C.; SOUZA-SILVA, E. A.; ASSUMPÇÃO, C. F.; ZINI, C. A.; WELKE, J. E. **Validation of an analytical method using HS-SPME-GC/MS-SIM to assess the exposure risk to carbonyl compounds and furan derivatives through beer consumption.** Food Additives & Contaminants: Part A, v. 36, n. 12, p. 1808⁻¹ 821, 2019. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1672897>.
- HERNANDES, K. C.; SOUZA-SILVA, É. A.; ASSUMPÇÃO, C. F.; ZINI, C. A.; WELKE, J. E. **Carbonyl compounds and furan derivatives with toxic potential evaluated in the brewing stages of craft beer.** Food Additives & Contaminants: Part A, v. 37, n. 1, p. 61-68, 2020. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1675911>.
- HUMIA, B. V.; SANTOS, K. S.; BARBOSA, A. M.; SAWATA, M.; MENDONÇA, M. D. C.; PADILHA, F. F. **Beer molecules and its sensory and biological properties: A review.** Molecules, v. 24, n. 8, p. 1568, 2019.
- IAL - Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: **Métodos Físico-Químico para análise de alimentos, 4ª.ed. 1ªEd Digital.** São Paulo: ANVISA, 2008.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia. Normalização e Qualidade industrial: Orientação sobre validação de métodos analíticos. **DOQ-CG-CRE-008**, 2020.
- JARDIM, I. C. S. F. **Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas.** Scientia Chromatographica, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

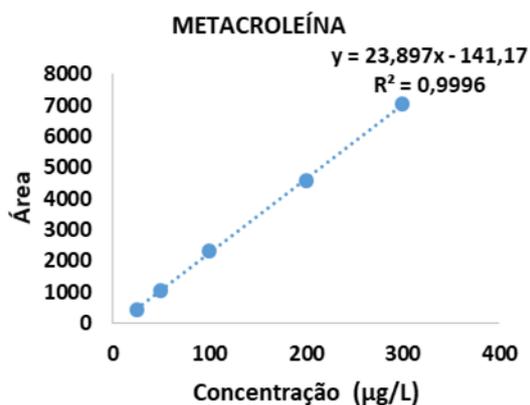
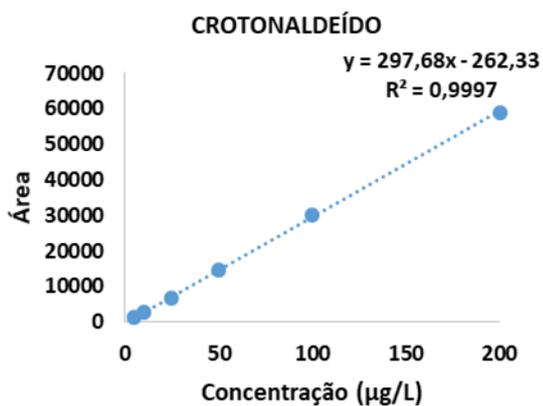
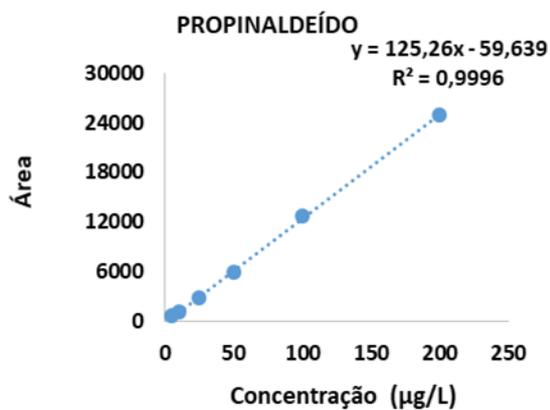
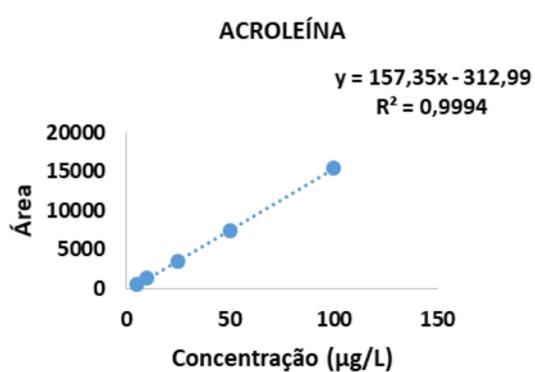
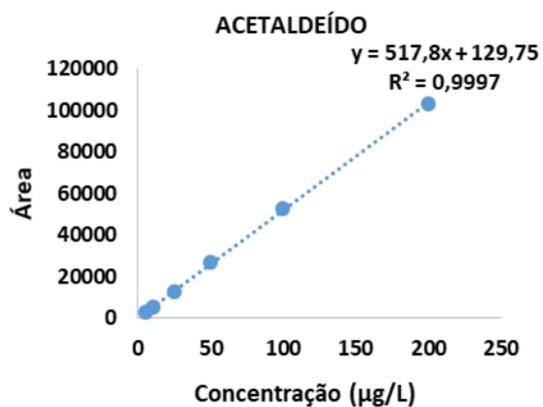
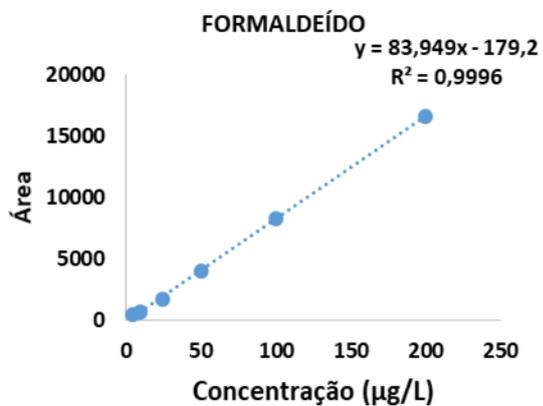
- KEMPA, A. P.; THOMÉ, B. C.; CONTO, R. M. de. **Produção de cerveja artesanal tipo ale utilizando mel de diferentes floradas como adjunto**. Brazilian Journal of Food Research, v. 8, n. 1, p. 105-125, 2017. DOI: 10.3895/rebrapa.v8n1.3812.
- KISHIKAWA, Naoya; EL-MAGHRABEY, Mahmoud H.; KURODA, Naotaka. **Chromatographic methods and sample pretreatment techniques for aldehydes determination in biological, food, and environmental samples**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 175, p. 112782, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.112782>.
- KUIAVSKI, M. P.; BEZERRA, J. R. M. V.; TEIXEIRA, Â. M.; RIGO, M. **Elaboração de pães com adição de farinha do bagaço de malte**. Brazilian Journal of Development, v. 6, n. 7, p. 53208-53221, 2020. [Htpps://doi.org/10.34117/bjdv6n7-823](https://doi.org/10.34117/bjdv6n7-823).
- LAGHRIB, F.; LAHRICH, S.; EL MHAMMEDI, M. A. **Review-Recent Advances in Direct and Indirect Methods for Sensing Carbonyl Compounds Aldehydes in Environment and Foodstuffs**. Journal of The Electrochemical Society, v. 166, n. 15, p. B1543, 2019. DOI: 10.1149/2.0761915jes.
- LAGO, L. O.; NICOLLI, K. P.; MARQUES, A. B.; ZINI, C. A.; WELKE, J. E. **Influence of ripeness and maceration of the grapes on levels of furan and carbonyl compounds in wine—Simultaneous quantitative determination and assessment of the exposure risk to these compounds**. Food chemistry, v. 230, p. 594-603, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.090>.
- LAGO, L.O.; WELKE, J. E. **Carbonyl compounds in wine: factors related to presence and toxic effects**. Ciência Rural, v. 49, n. 8, 2019. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20190349>.
- LEÃO, P. R. P.; MEDINA, A. L.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. **Decomposição de amostras de cerveja com sistema de refluxo para determinação monoelementar por F AAS/AES e determinação multielementar por MIP OES**. Brazilian Journal of Food Technology, v. 21, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/1981-6723.6217>.
- LEHNHARDT, Florian; GASTL, Martina; BECKER, Thomas. **Forced into aging: Analytical prediction of the flavor-stability of lager beer. A review**. Critical reviews in food science and nutrition, v. 59, n. 16, p. 2642-2653, 2019. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1462761>
- LOPES, M. P.; BARBOSA, R. P.; FEITOSA, L. T. B.; NOGUEIRA, I. de O.; LEONI, J. N.; DE MORAES, P. A. V.; Mazini, S. R. **Desenvolvimento do processo produtivo da cerveja artesanal**. Revista Engenharia em Ação UniToledo, v. 3, n. 1, p. 2⁻¹, 2018.
- MASCIA, I.; FADDA, C.; KARABÍN, M.; DOSTÁLEK, P.; DEL CARO, A. **Aging of craft durum wheat beer fermented with sourdough yeasts**. LWT-Food Science and Technology, v. 65, p. 487-494, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.026>.
- MASSON, J.; CARDOSO, M. D. G.; ZACARONI, L. M.; ANJOS, J. P. D.; SACKZ, A. A.; MACHADO, A. M. D. R.; NELSON, D. L. **Determination of acrolein, ethanol, volatile acidity, and copper in different samples of sugarcane spirits**. Food Science and Technology, v. 32, n. 3, p. 568-572, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612012005000075>.

- MELLO, J. A. V. B.; DOURADO, J. D. de A.; DA SILVA, J. L. N. **Percepção dos consumidores da região metropolitana do Rio de Janeiro sobre cervejas artesanais e seus atributos.** GCG: revista de globalización, competitividad y gobernabilidad, v. 11, n. 2, p. 111⁻¹ 30, 2017. DOI: 10.3232/GCG.2017.V11.N2.06.
- MELLO, J. A. V.B.; SILVA, J. L. N. da. **Requisitos de produto para um projeto de cerveja artesanal.** Innovar, v. 30, n. 77, p. 39-52, 2020. <https://doi.org/10.15446/innovar.v30n77.87428>.
- MOREIRA, N.; ARAÚJO, A. M.; ROGERSON, F.; VASCONCELOS, I.; DE FREITAS, V.; DE PINHO, P. G. **Development and optimization of a HS-SPME-GC-MS methodology to quantify volatile carbonyl compounds in Port wines.** Food chemistry, v. 270, p. 518-526, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.093>.
- NCUBE, S.; DUBE, S.; NINDI, M. M. **Determination of volatile compounds during deterioration of African opaque beer using a stir bar sorptive extraction technique and gas chromatography-high resolution mass spectrometry.** Current Research in Food Science, v. 3, p. 256-267, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2020.10.003>.
- NEŠPOR, J.; KARABÍN, M.; HANKO, V.; DOSTÁLEK, P. **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. <https://doi.org/10.1002/jib.493>.
- OLIVEIRA, M. D.; FABER, C. R.; OVIEDO, M. S. V. P. **Erva-mate (*Ilex paraguariensis* Saint Hilaire) como substituto parcial do lúpulo amargor na fabricação da cerveja artesanal.** REBRAPA-Brazilian Journal of Food Research, v. 8, n. 4, p. 1⁻¹ 2, 2017.
- PAYÁ, A. L.; GARCIA, L.; CUNHA, M. D. C.; CRESPI, N. M.; DE ANGELLIS, V. C.; LEONI, J. N.; DE MORAES, P. A. V. **Produção e caracterização de cerveja artesanal adicionada de aveia (*Avena sativa*).** Revista Engenharia em Ação UniToledo, v. 4, n. 2, p. 52-66, 2019.
- PENG, Z.; LUO, Y., SONG, C., ZHANG, Y., SUN, S.; YU, A.; XIE, J. **A novel methodology and strategy to detect low molecular aldehydes in beer based on charged microdroplet driving online derivatization and high resolution mass spectrometry.** Química alimentar, p. 132380, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132380>.
- PETERLE, G. P.; HERNANDES, K. C.; SCHMIDT, L.; MACIEL, J. B. H.; ZINI, C. A.; WELKE, J. E. **Exposure risk to carbonyl compounds and furfuryl alcohol through the consumption of sparkling wines.** Ciência Rural, v. 49, n. 3, 2019. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180986>.
- PIMENTA, L. B.; RODRIGUES, J. K. L. A.; SENA, M. D. D.; CORRÊA, A. L. A.; PEREIRA, R. L. G. I. **A história e o processo da produção da cerveja: uma revisão.** Cadernos de Ciência & Tecnologia, v. 37, n. 3, p. 26715, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.35977/0104-1096.cct2020.v37.26715>.
- RAMOS, G. C. B.; PANDOLFI, M. A. **A Evolução do Mercado de Cervejas Artesanais no Brasil.** Revista Interface Tecnológica, v. 16, n. 1, p. 480-488, 2019.

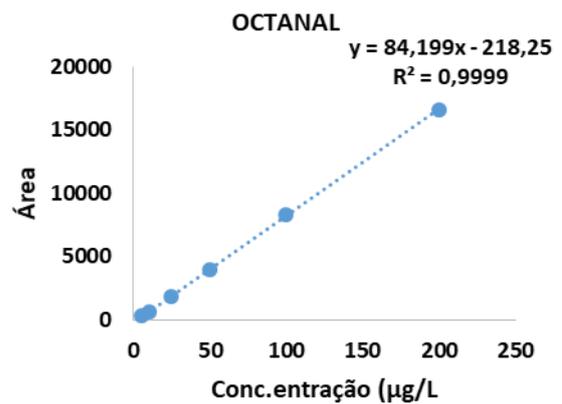
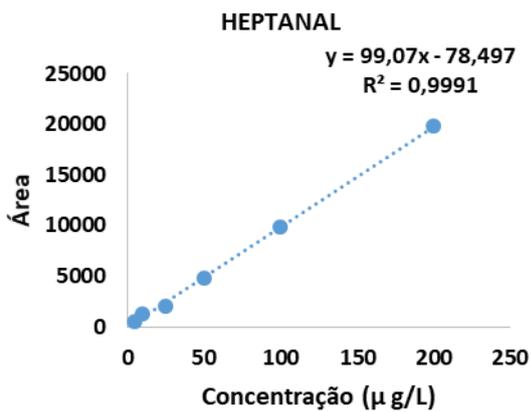
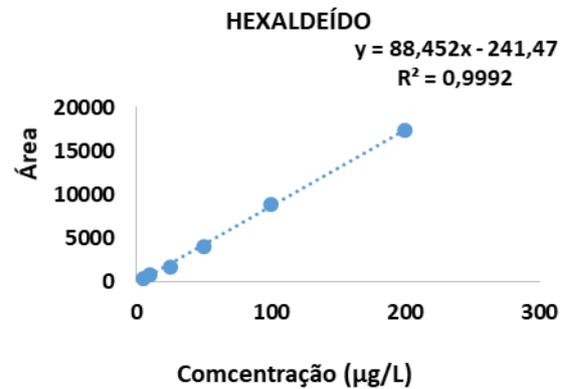
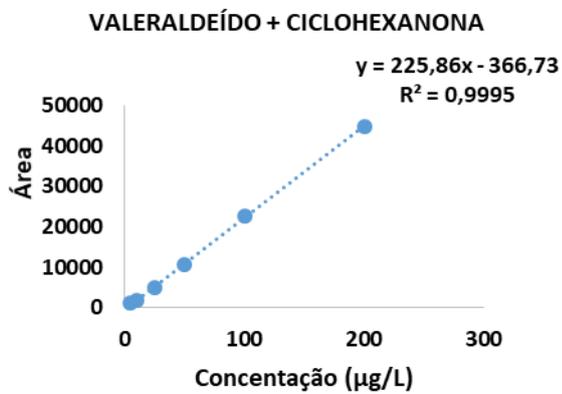
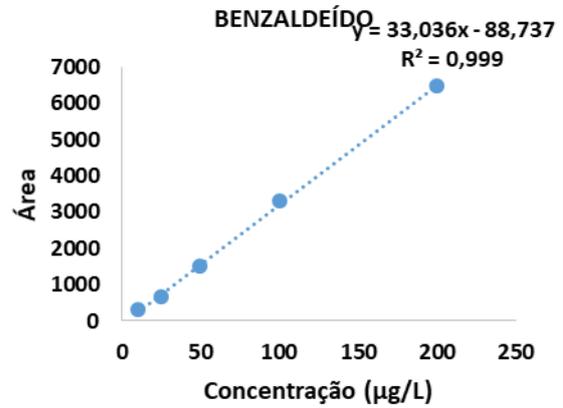
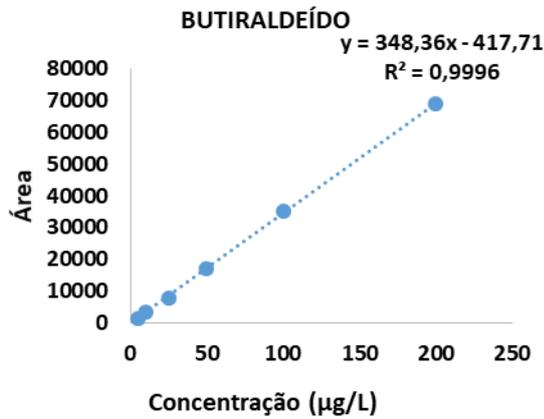
- REICHEL, S.; CARVALHO, D. O.; SANTOS, J. R.; BEDNAR, P.; RODRIGUES, J. A.; GUIDO, L. F. **Profiling the volatile carbonyl compounds of barley and malt samples using a low-pressure assisted extraction system.** *Food Control*, v. 121, p. 107568, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107568>.
- RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** *Química nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RICO-YUSTE, A.; GONZÁLEZ-VALLEJO, V.; BENITO-PEÑA, E.; DE LAS CASAS ENGEL, T.; ORELLANA, G.; MORENO-BONDI, M. C. **Furfural determination with disposable polymer films and smartphone-based colorimetry for beer freshness assessment.** *Analytical chemistry*, v. 88, n. 7, p. 3959-3966, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00167>.
- RIEDL, R.; DÜNZER, N.; MICHEL, M.; JACOB, F.; HUTZLER, M **Beer enemy number one: genetic diversity, physiology and biofilm formation of *Lactobacillus brevis*.** *Journal of the Institute of Brewing*, v. 125, n. 2, p. 250-260, 2018. <https://doi.org/10.1002/jib.553>.
- RODHOUSE, L.; CARBONERO, F. **Overview of craft brewing specificities and potentially associated microbiota.** *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 59, n. 3, p. 462-473, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1378616>.
- ROSA, L. G.; DE OLIVEIRA, S. D. **Práticas e espaços de hospitalidade relacionados à cerveja.** *Brazilian Journal of Development*, v. 6, n. 10, p. 82940-82954, 2020. DOI: <https://doi.org/1034117/bjdv6n10-650>.
- SCHABO, D. C.; FREIRE, L.; SANT'ANA, A. S.; SCHAFFNER, D. W.; MAGNANI, M. **Mycotoxins in artisanal beers: An overview of relevant aspects of the raw material, manufacturing steps and regulatory issues involved.** *Food Research International*, p. 110114, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110114>.
- SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Microcervejarias no Brasil-características e oportunidades.** Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br>>. Acesso em: 04 de abril de 2021.
- SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **O mercado de cervejas artesanais no Brasil e em Santa Catarina-Cenários 2018 a 2020.** Disponível em: <<http://www.sebrae.com.br>>. Acesso em: 13 de maio de 2021a.
- SERAFIM, F. A. T. **O papel da cromatografia no controle de qualidade, conformidade e na rastreabilidade das aguardentes.** *Scientia Chromatographica*. V.10, n. 4, p. 230-242. 2018. <http://dx.doi.org/10.5935/sc.2019.002>.
- SILVA, H. A.; LEITE, M. A.; PAULA, A.R.V. de. **Cerveja e sociedade.** *Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade*, v. 4, n. 2, p. 85-91, 2016.
- SOUSA, V. M.; FOGAÇA, L. C. S. **Perfil Físico-Químico de Cervejas Artesanais e Industriais e Adequação dos Rótulos Quanto à sua Graduação Alcoólica.** ID on line *REVISTA DE PSICOLOGIA*, v. 13, n. 43, p. 440-447, 2019.

- SRINIVASAN, S.; DUBEY, K. K.; SINGHAL, R.S. **Influence of food commodities on hangover based on alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase activities.** *Current Research in Food Science*, v. 1, p. 8⁻¹ 6, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2019.09.001>.
- THOMSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis.** *Pure Appl. Chem*, v. 74, n. 5, p. 835, 2002.
- TOMASI, A. R. P.; FORTES, R. **O Produtor de Cerveja Caseira em Belo Horizonte: Características do Grupo e Interfaces com os Estudos do Lazer.** *LICERE-Revista do Programa de Pós-graduação Interdisciplinar em Estudos do Lazer*, v. 22, n. 3, p. 34-63, 2019. <https://doi.org/10.35699/1981-3171.2019.15265>.
- TRUEBA, P. B.; JASKULA-GOIRIS, B.; DITRYCH, M., FILIPOWSKA, W.; DE BRABANTER, J.; DE ROUCK, G.; DE CLIPPELEER, J. **Monitoring the evolution of free and cysteinylated aldehydes from malt to fresh and forced aged beer.** *Food Research International*, v. 140, p. 110049, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.110049>.
- VIEIRA, F. S.V; REBOUÇAS, M. V.; ANDRADE, J. B. de. **Determinação de compostos carbonilados e carboxilados em derivados de petróleo.** *Química Nova*, v. 35, n. 8, p. 1644⁻¹ 656, 2012.
- WANG, T.; GAO, X.; TONG, J.; CHEN, L. **Determination of formaldehyde in beer based on cloud point extraction using 2, 4-dinitrophenylhydrazine as derivative reagent.** *Food chemistry*, v.131, n.4, p.1577⁻¹ 582,2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.021>.
- WILLIAMS, J., LI, H., ROSS, A. B., & HARGREAVES, S. P. **Quantification of the influence of NO₂, NO and CO gases on the determination of formaldehyde and acetaldehyde using the DNPH method as applied to polluted environments.** *Atmospheric Environment*, v. 218, p. 117019, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.117019>.
- ZACARONI, L. M.; CARDOSO, M. D. G.; SACZK, A. A.; SANTIAGO, W. D.; ANJOS, J. P. D.; MASSON, J.; NELSON, D. L. **Caracterização e quantificação de contaminantes em aguardentes de cana.** *Química Nova*, v. 34, n. 2, p. 320-324, 2011.
- ZHAO, J., WANG, G., CAO, T., e GUO, Z. **Development of a novel derivatase assay for formaldehyde determination by HPLC in beer samples.** *Food analytical methods*, v. 9, n. 1, p. 156⁻¹ 63, 2016. DOI 10.1007/s12161-015-0183-x.
- THOMSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis.** *Pure Appl. Chem*, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

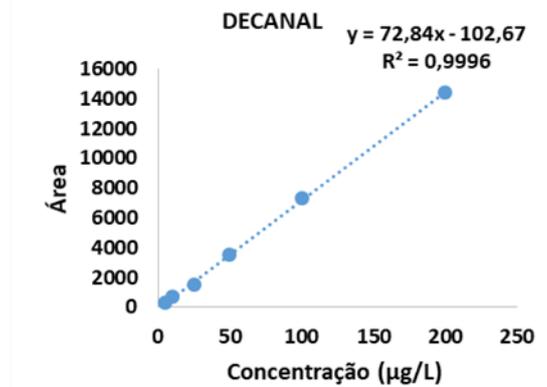
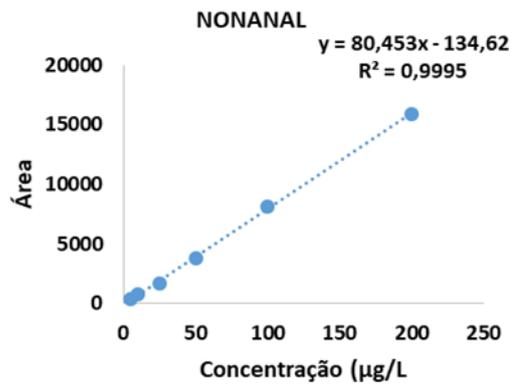
ANEXO I - GRÁFICOS DAS CURVAS ANALÍTICAS



ANEXO I – GRÁFICOS DAS CURVAS ANALÍTICAS - CONTINUAÇÃO



ANEXO 1 - GRÁFICOS DAS CURVAS ANALÍTICAS - CONTINUAÇÃO



PRODUÇÃO TÉCNICA E CIENTÍFICA

Trabalhos completos publicados em anais de eventos

ACACIO, M. S. S.; ANJOS, J. P.; MACHADO, B. A. S. Presence of carbonyl compounds in beers - a brief review. In: VII Simpósio Internacional em Inovação e Tecnologia (SIINTEC), 2021, Salvador-BA.

ACACIO, M. S. S.; ANJOS, J. P.; MACHADO, B. A. S. Presença de HPAs em amostras de ar atmosférico oriundo de ambientes fechados - Uma breve revisão. In: V Simpósio Internacional em Inovação e Tecnologia (SIINTEC), 2019, Salvador-BA.

VII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INNOVATION AND TECHNOLOGY (SIINTEC)
One Planet, one Ocean and one Health - 2021

PRESENCE OF CARBONYL COMPOUNDS IN BEERS - A BRIEF REVIEW

Marinice Santiago dos Santos Acácio^{1*}; Jeancarlo Pereira dos Anjos¹; Bruna Aparecida Souza Machado¹ - *marinicesantiago@yahoo.com.br

¹Centro Universitário SENAI CIMATEC - Av. Orlando Gomes, 1845 - Piatã, 41650-010, Salvador - BA



PRESENÇA DE HPAs EM AMOSTRAS DE AR ATMOSFÉRICO ORIUNDO DE AMBIENTES FECHADOS – UMA BREVE REVISÃO

Marinice Santiago dos Santos Acácio^{1*}; Jeancarlo Pereira dos Anjos¹; Bruna Aparecida Souza Machado¹ - *marinicesantiago@yahoo.com.br

¹Centro Universitário SENAI CIMATEC - Av. Orlando Gomes, 1845 - Piatã, 41650-010, Salvador - BA