



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO NORTE DO TOCANTINS**  
**CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE ARAGUAÍNA**  
**CURSO DE LICENCIATURA EM QUÍMICA**

**NATÁLIA FERREIRA ALMEIDA**

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO POR GC-MS E HPLC-DAD DE UMA  
NOVA CERVEJA FERMENTADA POR GRÃOS DE KEFIR E SUA COMPARAÇÃO  
À CERVEJA CONVENCIONAL**

Araguaína (TO)

2022

NATÁLIA FERREIRA ALMEIDA

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO POR GC-MS E HPLC-DAD DE UMA  
NOVA CERVEJA FERMENTADA POR GRÃOS DE KEFIR E SUA COMPARAÇÃO  
À CERVEJA CONVENCIONAL**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em Química, da UFNT - Universidade Federal do Norte do Tocantins - Campus universitário de Araguaína, como requisito para a obtenção do título de Licenciada em Química, sob orientação do Prof. Dr. Edenilson dos Santos Niculau

Araguaína (TO)

2022

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins**

---

- A447d Almeida, Natália Ferreira .  
DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO POR GC-MS E HPLC-DAD DE  
UMA NOVA CERVEJA FERMENTADA POR GRÃOS DE KEFIR E SUA  
COMPARAÇÃO À CERVEJA CONVENCIONAL. / Natália Ferreira Almeida. –  
Araguaína, TO, 2022.  
80 f.  
  
Monografia Graduação - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus  
Universitário de Araguaína - Curso de Química, 2022.  
Orientador: Ednilson dos Santos Niculau  
  
1. Cerveja. 2. Kefir. 3. Fermentação. 4. Cromatografia. I. Título

**CDD 540**

---

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

**Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).**


NATÁLIA FERREIRA ALMEIDA

**DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO POR GC-MS E HPLC-DAD DE UMA  
NOVA CERVEJA FERMENTADA POR GRÃOS DE KEFIR E SUA COMPARAÇÃO  
À CERVEJA CONVENCIONAL**

Monografia apresentada ao Curso de Licenciatura em QUÍMICA, da Universidade Federal do Norte do Tocantins - UFNT, Campus universitário de Araguaína, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Química.


Aprovada em 22 de novembro de 2022.

Banca examinadora:

Documento assinado digitalmente  
 EDENILSON DOS SANTOS NICULAU  
Data: 22/11/2022 21:39:40-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>


---

Prof. Dr. Edenilson dos Santos Niculau (orientador), UFNT

Documento assinado digitalmente  
 JOSEILSON ALVES DE PAIVA  
Data: 24/11/2022 07:36:44-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof.<sup>a</sup> Dr. Joseilson Alves de Paiva (banca examinadora), UFNT

Documento assinado digitalmente  
 DANIEL BARBOSA ALCANTARA  
Data: 23/11/2022 10:13:54-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof. Dr. Daniel Barbosa Alcântara (banca examinadora), UFNT

Araguaína (TO)

2022

Dedico este trabalho as minhas irmãs Yasmim  
Ferreira Almeida e Gabrielly Ferreira Almeida,  
por todo amor, carinho e força. Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pelas oportunidades que me foram concedidas ao longo dessa jornada. Agradeço imensamente aos meus pais, Anestina Ferreira Almeida e Elton Souza Almeida, por todo o amor, força, dedicação e por sempre depositarem confiança em mim. Às minhas queridas irmãs, Yasmim Ferreira Almeida e Gabrielly Ferreira Almeida, sem vocês minha vida não teria tanta alegria.

Aos que não estão mais presentes fisicamente, mas permanecem vivos em meu coração, agradeço à minha avó Maria de Lourdes Souza, pelo carinho e amor, e ao meu avô Pedro Gracia de Oliveira, pelo incentivo, pelas palavras de conforto e por sempre me ouvir quando eu precisava compartilhar minhas conquistas. Gostaria muito de compartilhar mais essa com o senhor, mas sigo em frente, vô. À minha madrinha, Jane Erika, agradeço por ter me acompanhado no início da minha trajetória acadêmica. Agradeço também aos presentes, Anestina Ferreira de Oliveira e Eptácio Pinto de Almeida.

Aos amigos que cativei ao longo do caminho, obrigada por cada momento de alegria, diversão e acolhimento. Vocês foram essenciais durante a minha formação, mantendo-me firme em meu propósito e não me deixando desanimar. À família Moura, pelo acolhimento, carinho e abrigo. Aos vizinhos que se tornaram amigos, obrigada pelas noites de risadas e experiências culinárias. Agradeço, de forma especial, a todos os professores que passaram pela minha vida e contribuíram significativamente para a minha educação.

Por fim, e não menos importante, agradeço ao meu querido professor, orientador e amigo, Edenilson dos Santos Niculau, por todos os conselhos, ensinamentos e pela amizade ao longo desses anos de aprendizado. Ao cervejeiro João Roque Frederico, pelos valiosos ensinamentos na produção de cerveja. Aos técnicos de laboratório, Gildeth, Gilberto e Karolina, que nos auxiliaram durante todo o processo. À Universidade Federal do Norte do Tocantins, aos professores do colegiado do curso de Licenciatura em Química e ao Programa de Educação Tutorial, pelo fomento e apoio durante esses anos de estudo, meu muito obrigada.

“Vai em frente, minha filha!”

Pedro Gracia de Oliveira

## RESUMO

A cerveja é uma das bebidas mais antigas e mais consumidas no mundo, a mesma possui uma composição química complexa caracterizada por aminoácidos, carboidratos, minerais e vitaminas. A bebida também contribui para evitar uma série de problemas relacionados a saúde além da busca constante por inovações na indústria cervejeira. Quando aliada aos benefícios nutricionais e medicinais do Kefir, a bebida passa a ter atividades anti-inflamatórias e antiulcerogênicas. Com base nisso, o presente trabalho buscou analisar o perfil químico de uma nova cerveja fermentada por grãos de Kefir por GC-MS e HPLC-DAD e realizar o comparativo com a cerveja convencional. Para o estudo, foram produzidas três amostras de cerveja, uma convencional, uma fermentada com grãos de Kefir em temperatura ambiente e outra em temperatura controlada, a fim de verificar a composição química de cada uma. As cervejas com Kefir apresentaram menor teor alcoólico do que a convencional *Barley Wine*, sendo respectivamente 7,3% e 8,9%. A extração dos compostos se deu por HS-SPME a qual se mostrou muito promissora por ser uma técnica simples, sensível e por não utilizar solventes. Foram identificados 13 compostos no Kefir sendo a acetoina e o ácido acético os mais abundantes. Da mesma forma, 18 compostos foram encontrados nas cervejas, sendo os majoritários o etanol, acetato de etila, álcool isopentílico e acetato de isopentila. Entretanto, a cerveja convencional apresentou 4 compostos a menos em relação as com Kefir, mostrando que as cervejas probióticas possuem um perfil químico mais rico. Pela extração das frações por SPE, verificou-se que as cervejas possuíam compostos hidrofílicos, ressaltando o estilo de cerveja adotado, e a presença de compostos fenólicos como flavonóides, entre eles rutina e quercetina. Verificou-se que apesar da diferença de fermento utilizado, os perfis cromatográficos foram muito semelhantes, ou seja, mesmo alterando a forma de fermentação obteve-se o mesmo produto, cerveja. Por fim, por meio das análises estatísticas, PCA, HCA e PLS-DA, constatou-se que as cervejas fermentadas com grãos de Kefir possuíam maior similaridade entre elas do que com a cerveja convencional.

**Palavras-chaves:** Cerveja; Kefir; Fermentação; Cromatografia.

## ABSTRACT

Beer is one of the oldest and most widely consumed beverages in the world, It has a complex chemical composition characterized by amino acids, carbohydrates, minerals, and vitamins. The beverage also contributes to prevent a number of health-related problems, in addition to the constant search for innovations in the brewing industry. When combined with the nutritional and medicinal benefits of Kefir, the beverage has anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities. Based on this, the present work sought to analyze the chemical profile of a new beer fermented by Kefir grains by GC-MS and HPLC-DAD and make the comparison with conventional beer. For the study, three kind of beer samples were produced, one conventional, one fermented with Kefir grains at room temperature and another at controlled temperature, in order to verify the chemical composition of each one. The beers with Kefir had lower alcohol content than the conventional Barley Wine, being respectively 7.3% and 8.9%. The extraction of the compounds was done by HS-SPME, which proved to be very promising because it is a simple and sensitive technique that does not use solvents. Thirteen compounds were identified in the Kefir, being acetoin and acetic acid the most abundant. Similarly, 18 compounds were found in the beer, being ethanol, ethyl acetate, isopentyl alcohol and isopentyl acetate the most abundant. However, the conventional beer presented 4 fewer compounds compared to those with Kefir, showing that the probiotic beers have a richer chemical profile. By extraction of the fractions by SPE, it was found that the beers had hydrophilic compounds, highlighting the style of beer adopted, and the presence of phenolic compounds such as flavonoids, including rutin and quercetin. It was verified that despite the difference in the yeast used, the chromatographic profiles were very similar, i.e., even changing the form of fermentation the same product, beer, was obtained. Finally, by means of statistical analysis, PCA, HCA and PLS-DA, it was found that the beers fermented with Kefir grains had greater similarity between them than with conventional beer.

**Keywords:** Beer; Kefir; Fermentation; Chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Flores do lúpulo utilizadas para a produção de cervejas. ....	21
<b>Figura 2</b> - Estruturas químicas das substâncias majoritárias do lúpulo: $\alpha$ -ácidos e $\beta$ -ácidos..	22
<b>Figura 3</b> - Principais processos de produção de cerveja em ordem cronológica.....	24
<b>Figura 4</b> - Estrutura química dos compostos fenólicos analisados na cerveja probiótica. ....	30
<b>Figura 5</b> - Representação da microextração em fase sólida no modo headspace (HS-SPME). .....	31
<b>Figura 6</b> - Grãos de Kefir cultivados no leite. ....	33
<b>Figura 7</b> - Sequência metodológica da análise do Kefir: a) fermentação; b) extração dos voláteis; c) análise no GC-MS; d) identificação dos compostos. ....	34
<b>Figura 8</b> - Processo de mosturação e seus equipamentos .....	36
<b>Figura 9</b> - Teste de iodo realizado na etapa da mostura. ....	36
<b>Figura 10</b> - Resfriamento do mosto .....	38
<b>Figura 11</b> - Garrações adaptados com mangueiras para evitar oxidação da bebida. ....	39
<b>Figura 12</b> - Envase das cervejas .....	40
<b>Figura 13</b> - Extração em fase sólida com o auxílio de uma bomba de pressão.....	41
<b>Figura 14</b> – HPLC-DAD do LabCrom da UFNT.....	41
<b>Figura 15</b> - Cromatograma de íons totais dos voláteis do Kefir fermentado por 24 h com tempo de extração de 20 min. ....	44
<b>Figura 16</b> - Cromatograma de íons totais dos voláteis do Kefir fermentado em 48 h com tempo de extração de 55 min. ....	44
<b>Figura 17</b> - Espectro de massa do ácido acético (acima) e da acetoina (a baixo). A esquerda obtida no banco de dados Nist Webbook e a direita experimentalmente. ....	45
<b>Figura 18</b> - Proposta de fragmentação do ácido acético.....	46
<b>Figura 19</b> - Proposta de fragmentação da acetoina.....	46
<b>Figura 20</b> - Cromatogramas de íons totais dos voláteis das cervejas artesanais com tempo de extração de 30min. Em vermelho cerveja convencional, azul cerveja com Kefir em temperatura controlada e preto com Kefir em temperatura ambiente. ....	49
<b>Figura 21</b> - Espectros de massa do acetato de etila. A esquerda espectro obtido no banco de dados Nist Webbook e a direita experimentalmente. ....	52
<b>Figura 22</b> - Espectros de massa do álcool isopentílico. A esquerda espectro obtido no banco de dados Nist Webbook e a direita experimentalmente. ....	52

<b>Figura 23</b> - Espectros de massa do acetato de isopentila. A esquerda espectro obtido no banco de dados Nist Webbook e a direita experimentalmente. ....	52
<b>Figura 24</b> - Proposta de fragmentação do acetato de etila. ....	53
<b>Figura 25</b> - Proposta de fragmentação do álcool isopentílico. ....	54
<b>Figura 26</b> - Proposta de fragmentação do acetato de isopentila. ....	55
<b>Figura 27</b> - Estrutura química do $\alpha$ -humuleno, principal composto encontrado no óleo essencial do lúpulo. ....	56
<b>Figura 28</b> - Cromatogramas sobrepostos das cervejas em fração aquosa. Em preto cerveja fermentada por kefir em temperatura controlada, rosa em temperatura ambiente e azul cerveja convencional. A primeira em 220 nm e a segunda em 274 nm. ....	57
<b>Figura 29</b> - Cromatogramas sobrepostos das cervejas, fração acetato de etila. Em preto cerveja fermentada por kefir em temperatura controlada, rosa em temperatura ambiente e azul cerveja convencional. A primeira 220 nm e a segunda 274 nm. ....	58
<b>Figura 30</b> - Cromatogramas sobrepostos das cervejas, fração diclorometano. Em preto cerveja fermentada por kefir em temperatura controlada, azul em temperatura ambiente e rosa cerveja convencional. A primeira 220 nm e a segunda 274 nm. ....	58
<b>Figura 31</b> - Cromatogramas sobrepostos das cervejas, fração hexano. Em preto cerveja fermentada por kefir em temperatura controlada, rosa em temperatura ambiente e azul cerveja convencional. A primeira 220 nm e a segunda 274 nm. ....	59
<b>Figura 32</b> - Cromatogramas sobrepostos das cervejas, fração metanol. Em preto cerveja fermentada por kefir em temperatura controlada, rosa em temperatura ambiente e azul cerveja convencional. A primeira 220 nm e a segunda 274 nm. ....	59
<b>Figura 33</b> - Espectro de UV da fração aquosa da cerveja fermentada por kefir em temperatura ambiente com maior absorção em 257 nm em 3,166 min. ....	60
<b>Figura 34</b> - Espectros de UV dos isômeros extraídos das amostras de cerveja com kefir em temperatura ambiente em hexano. A esquerda em 11,10 min e a direita em 12,08 min. ....	61
<b>Figura 35</b> - Comparação das frações em metanol das cervejas análise em 254 nm: Preto - cerveja probiótica fermentada em temperatura ambiente; Rosa - cerveja probiótica fermentada em temperatura controlada; Azul - cerveja convencional. ....	61
<b>Figura 36</b> - Comparação dos perfis da amostra padrão (linha preta) com a das cervejas de kefir fermentada em temperatura ambiente em fração aquosa (linha azul) e em fração metanólica (linha rosa). ....	62
<b>Figura 37</b> - Espectros de UV da rutina: A esquerda da amostra padrão e a direita da cerveja fermentada com Kefir em temperatura ambiente. ....	62

<b>Figura 38</b> - Estruturas químicas dos compostos fenólicos estudados. ....	63
<b>Figura 39</b> - Comparação dos perfis cromatográficos das cervejas em fração aquosa no início das corridas. Preto - cerveja probiótica fermentada em temperatura ambiente; Rosa - cerveja probiótica fermentada em temperatura controlada; Azul - cerveja convencional. ....	64
<b>Figura 40</b> - Representação gráfica da PCA por meio de um gráfico bidimensional, scores. ...	65
<b>Figura 41</b> - Representação gráfica em biplot dos compostos responsáveis pela formação dos grupos. ....	66
<b>Figura 42</b> - Representação gráfica da PLS-DA por meio de um gráfico bidimensional. ....	67
<b>Figura 43</b> - Representação gráfica da classificação da PLS-DA. A estrela vermelha indica o melhor classificador. ....	68
<b>Figura 44</b> - Representação gráfica em VIP scores com base no modelo PLS-DA. ....	69
<b>Figura 45</b> - Representação gráfica da HCA por meio de um dendrograma. ....	70
<b>Figura 46</b> - Representação gráfica de HCA por meio de heatmap. ....	71

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais íons presentes em água e suas atuações no perfil sensorial das cervejas. .....	20
<b>Tabela 2</b> - Compostos químicos encontrados na cerveja e off-flavour causado na bebida. ....	24
<b>Tabela 3</b> - Polifenóis encontrados nas cervejas de controle e Kefir expressos como média $\pm$ desvio padrão de seis medidas obtidas com 0, 10, 20, 30, 60 e 120 dias após a envase das bebidas. ....	30
<b>Tabela 4</b> - Composição Química da água mineral comercial Jalapão e características Físico-Químicas da mesma. ....	36
<b>Tabela 5</b> - Compostos químicos identificados no Kefir fermentado em 48h com tempo de extração de 55min. ....	47
<b>Tabela 6</b> - Constituintes químicos voláteis presentes nas cervejas extraídos por HS-SPME e analisadas por GC/MS. ....	51

## LISTA DE SIGLAS

<b>a.C</b>	Antes de Cristo
<b>ABV</b>	Álcool por volume ( <i>Alcohol by Volume</i> )
<b>CAR/PDMS</b>	Carboxen/Polidimetilsiloxano
<b>GC-MS</b>	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas ( <i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i> )
<b>HCA</b>	Análise de Agrupamento Hierárquico ( <i>Hierarchical Cluster Analysis</i> )
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
<b>HS</b>	<i>Headspace</i>
<b>KTA</b>	Cerveja de Kefir fermentada em temperatura ambiente
<b>KTC</b>	Cerveja de Kefir fermentada em temperatura controlada
<b>LV</b>	Cerveja convencional
<b>PC</b>	Componentes Principais (Principal components)
<b>PCA</b>	Análise de Componentes Principais ( <i>Principal Component Analysis</i> )
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>PDMS/DVB</b>	Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno
<b>PIB</b>	Produto Interno Bruto
<b>PLS-DA</b>	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais ( <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i> )
<b>SPE</b>	Extração em fase sólida (Solid-phase extraction)
<b>SPME</b>	Microextração em fase sólida ( <i>Solid phase microextraction</i> )

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	16
2. OBJETIVOS.....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	18
3.1 A cerveja .....	18
3.2 Ingredientes básicos para a produção das cervejas .....	19
3.3 Processos de produção de cerveja.....	22
3.4 Aspectos nutricionais da bebida .....	26
3.5 O Kefir: benefícios e aplicações .....	26
3.6 Uma nova cerveja fermentada por Kefir.....	28
3.7 Análises: extração, separação e detecção.....	30
4. METODOLOGIA .....	32
4.1 Período de execução do trabalho .....	32
4.2 Cultivo e análise do Kefir .....	32
4.2.1 O Kefir: cultivo.....	32
4.2.2 Microextração em fase sólida.....	33
4.2.3 Preparação do material, otimização do método de análise e extração.....	33
4.2.4 Análise via GC-MS .....	34
4.3 Produção das bebidas.....	35
4.3.1 Insumos cervejeiros .....	35
4.4 Análise das cervejas.....	40
4.4.1 SPME e análise por GC-MS.....	40
4.4.2 Extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD.....	40
4.4.3 Análise dos compostos metabólicos - Flavonóides .....	42
4.4.4 Análise estatística multivariada .....	42
4.5 Identificação dos compostos .....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
5.1 Cultivo e produção do Kefir, análise e identificação dos produtos de fermentação.....	43
5.2 Produção das cervejas .....	48
5.3 Análise por GC-MS e perfil volátil.....	49
5.4 Análise por HPLC-DAD e perfil metabólico .....	56
5.3 Análise estatística multivariada .....	64
6. CONCLUSÃO .....	71
7. REFERÊNCIAS .....	73

## 1. INTRODUÇÃO

Dentre diversos produtos alimentícios vendidos no mercado que geram competitividade, encontra-se a cerveja, uma bebida altamente popular e que chama atenção dos inúmeros cervejeiros para estarem sempre buscando inovações e novos sabores (SENKARCINOVA et al., 2019). A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais antigas e está presente na história da humanidade desde o período Neolítico, apresentando uma grande importância política, econômica, religiosa, social e cultural (COELHO NETO et al., 2020). Portanto, percebe-se que a mesma merece destaque para estudos e investimentos já que beneficia inúmeros setores da sociedade.

Vale ressaltar que, a cerveja é a terceira bebida mais consumida no mundo (COELHO NETO et al., 2020, SCIOLI et al., 2022, OLIVEIRA NETO et al., 2017, AMBRA; PASTORE; LUCCHETTI, 2021), o Brasil é o terceiro maior produtor do mundo, sendo a bebida mais consumida entre os brasileiros, estimando-se anualmente em 82 L por habitante (FAGHERAZZI et al., 2018, SILVA et al., 2021). Assim, constata-se que é um produto que mobiliza a economia não apenas do Brasil, mas do mundo.

Além das importâncias econômicas, entrando nas questões de saúde, por se tratar de uma bebida rica em aminoácidos, carboidratos, minerais, vitaminas do complexo B, ácido cítrico, ascórbico e silícico, e compostos fenólicos (RODRIGUES et al., 2016), torna-se uma bebida altamente nutricional, prevenindo uma série de riscos à saúde. Com quatro ingredientes básicos é possível produzir uma série de cervejas com estilos diferentes, dependendo dos padrões das etapas de produção, fermentação, insumos, entre outros aspectos.

Sobre as possibilidades de inovação e otimização no processo de produção da bebida, Rodrigues et al (2016) mostrou em seu trabalho a possibilidade de alterar a parte fermentativa das cervejas, que são realizadas convencionalmente por leveduras, por grãos de Kefir, trazendo um caráter probiótico a bebida, conferindo inclusive atividades anti-inflamatórias e antiulcerogênicas na mesma.

A pesquisa desenvolvida por Rodrigues et al (2016) uniu as propriedades nutricionais e funcionais da cerveja com a associação simbiótica dos grãos de Kefir. Estes, são massas irregulares gelatinosas compostas por bactérias e leveduras que vivem em simbiose e quando imersos em água ou leite produzem uma bebida probiótica, denominada Kefir (BRACCINI et al., 2021). Os benefícios advindos do consumo dessa bebida são bem estudados, no qual o mesmo já mostrou ser eficiente em diversas aplicações, desde a área da saúde até mesmo na indústria alimentícia para a produção de queijos, iogurtes, gelatinas e outros.

Para se obter controle de qualidade da bebida e garantir segurança alimentar dos consumidores, existem padrões analíticos sobre os compostos que são estabelecidas diferentes técnicas de análise química e biológica. Entre elas, encontra-se a cromatografia e a espectroscopia, que hoje, são as técnicas mais utilizadas para análises em diversos setores, inclusive na indústria para determinar a qualidade e a composição de vários produtos (ANDRADE; LANÇAS, 2015).

Com base nisso, uma das formas de estudar o perfil químico dessas bebidas é utilizar esses instrumentos para identificar os compostos presentes, avaliando assim como esses efeitos benéficos ocorrem e quais substâncias são as responsáveis por essas atividades. De acordo com Rui-Aumatell et al (2014), mais de 1000 compostos provenientes das matérias primas de diversos tipos de cerveja já foram identificados, ao qual foram analisados durante e após o processo de produção.

A Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS - Gas Chromatography Mass Spectrometry), assim como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Arranjo de Diodos (HPLC-DAD - High Performance Liquid Chromatography Diode Array Detection), são métodos analíticos viáveis para a identificação e elucidação dessas substâncias químicas que quando aliados a boas técnicas, como a Microextração em Fase Sólida (SPME - *Solid phase microextraction*) e Extração em Fase Sólida (SPE - *Solid-phase extraction*) as respostas de detecção são muito precisas. Esses procedimentos de análise são utilizados também para realizar controle da qualidade de alimentos e isolamento de compostos de interesse (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008, PRADO; GODOY, 2003).

Por fim, para que se produza cerveja são requeridos quatro ingredientes básicos: malte, água, lúpulo e levedura. As diferentes combinações desses ingredientes e o uso dos materiais, resultam em um produto quimicamente complexo e variados estilos da bebida (RIU-AUMATELL et al., 2014, BETTENHAUSEN et al., 2018). Outrossim, o perfil químico da cerveja é diretamente influenciado pelo seu estilo, ou seja, pela forma como os seus insumos foram utilizados, desde o cozimento do malte ao lúpulo e fermentação.

Dessa forma, Rodrigues et al (2016) ao produzir a cerveja fermentada por Kefir, avaliou o perfil químico da bebida somente por HPLC com detectores no UV-VIS para detectar a presença de polifenóis, estudando assim as atividades anti-inflamatórias e antiulcerogênicas da mesma. Sabendo da importância envolvida na produção e consumo de cervejas, este trabalho visa enriquecer os estudos dos perfis químicos dessas bebidas utilizando a cromatografia e a espectroscopia para identificar e elucidar os compostos presentes nas mesmas, assim como

análise de uma cerveja fermentada por Kefir que apresenta características únicas, para possíveis comparativos com cervejas tradicionais.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Produzir uma cerveja convencional e uma probiótica com a adição de grãos de Kefir na etapa de fermentação, para posterior análise e comparação perfis químicos de cada bebida por meio de GC-MS e HPLC-DAD, identificando dessa forma os possíveis compostos que conferem a atividade probiótica da cerveja.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Cultivar os grãos de Kefir e analisar o produto da fermentação por GC-MS, buscando identificar os principais compostos presentes no processo;
- Produzir as cervejas com Kefir de acordo com a metodologia de Rodrigues et al (2016) com otimizações necessárias;
- Analisar o perfil químico volátil das bebidas por GC-MS;
- Estudar o perfil metabólico das cervejas por HPLC-DAD;
- Identificar os compostos, comparando os perfis químicos de ambas as cervejas;
- Propor mecanismos de fragmentações possíveis para as moléculas identificadas.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 A cerveja**

Dentro da história da humanidade, há estimativas de que o homem começou a produzir bebidas fermentadas cerca de 30 mil anos atrás, por volta de 8000, 7000 a.C., no início da urbanização no período Neolítico (COELHO-NETO et al., 2020, MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011). Na região Mesopotâmica, no mesmo período, as cervejas eram produzidas com cevada selvagem, na qual era utilizada não somente na alimentação e produção da bebida, mas também para usos cosméticos e medicinais (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 1983, KUNZE, 2019, SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2009).

A cerveja desenvolveu-se de modo comparável aos processos de fermentação de cereais, culturas de milho, centeio e cevado, entre os povos da Suméria, Babilônia, Egito e posteriormente pelos gregos e romanos no auge das suas civilizações (BORZANI et al., 2001, MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011). Os povos bárbaros, em especial os de origem germânica,

se destacaram na produção de cervejas, principalmente no século XIII, ao adicionar Lúpulo na bebida, deixando-a com aspectos mais característicos à bebida atual (BORZANI et al., 2001).

No Brasil, estima-se que a cerveja chegou em meados do século XIX com a chegada da família real portuguesa (GIORGI, 2015, MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011). De início, a bebida não alcançou tanta popularidade pela influência econômica e cultural que os vinhos portugueses, licores franceses e cachaça, tinham na época (DE SOUSA, 2004). Com a abertura dos portos brasileiros em 1810, a cerveja se difundiu ainda mais pela presença de ingleses nas capitais do país e toda cerveja consumida era importada (MELO; KARLS, 2022). Não se sabe com exatidão o início da produção da bebida no Brasil, entretanto, existe registro de sua comercialização no Jornal do Comércio do Rio de Janeiro em 27 de outubro de 1836 retratando a venda de cerveja brasileira (GIORGI, 2015, SILVA; LEITE; PAULA, 2016).

A partir de então, diversas cervejarias foram surgindo de acordo com as demandas sendo produzida cervejas artesanais em pequena escala até o início da primeira guerra mundial, quando se tornou difícil obter os insumos necessários para a produção, pois todos os materiais eram produzidos fora do Brasil, como Lúpulo e a cevada, dessa forma, para que a produção não cessasse, houve a substituição do malte de cevada por malte de arroz, trigo e milho (SILVA; LEITE; PAULA, 2016). Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor e consumidor de cerveja do mundo (COELHO NETO et al., 2020) e esse mercado auxilia diretamente no aumento do PIB do país.

### **3.2 Ingredientes básicos para a produção das cervejas**

A água no mundo cervejeiro é o principal ingrediente para a obtenção de um produto de qualidade, pois, a mesma é o componente majoritário da bebida, compondo em torno de 90% da massa da cerveja (ROSA; AFONSO, 2015, SILVA, 2017). A água cervejeira, dependendo da composição química, afeta o sabor da bebida assim como o processo enzimático necessário para a maltagem, como mostra a Tabela 1 (COELHO NETO et al., 2020), ou seja, os minerais presentes na mesma afetam o perfil organoléptico final (COELHO NETO et al., 2020, SILVA, 2017). Segundo Silva (2017) e Junior, Vieira e Ferreira (2009) águas duras, com muitos minerais, em especial o sulfato de cálcio e carbonato de cálcio, são utilizadas para a obtenção de cervejas lupuladas, escuras e amargas. Entretanto, as águas moles, com baixa concentração de minerais, especialmente em cálcio e magnésio, são utilizadas para produzir cervejas mais límpidas e maltadas, como as *pilsen* (JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009, SILVA, 2017). Vale ressaltar que, dependendo do estilo desejado é possível corrigir quimicamente a água de acordo com a sua composição, do mesmo modo, a água cervejeira precisa ter um pH adequado,

entre 5 e 7 para obter um bom processo enzimático (COELHO NETO et al.,2020, JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009).

**Tabela 1** - Principais íons presentes em água e suas atuações no perfil sensorial das cervejas.

<b>ÍON</b>	<b>Concentração típica (mg/L)</b>	<b>Atuação do íon</b>
Ca <sup>2+</sup>	50 a 150	Participa do metabolismo das leveduras e auxilia na clarificação e estabilização da cerveja
Mg <sup>2+</sup>	10 a 30	Contribuição similar ao cálcio e é importante nutriente para leveduras. Concentrações acima de 125 mg/L tem efeito laxante.
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Até 50	Neutralização da acidez do malte, podendo elevar a basicidade do mosto.
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	50 a 150	Na forma de sulfatos de Ca <sup>2+</sup> e Mg <sup>2+</sup> contribui para acentuar o amargor. Em cervejas muito amargas a concentração pode chegar até 350 mg/L. Quando superior a 400 mg/L causa sabor adstringente e a 750 mg/L diarreia.
Na <sup>+</sup>	Até 150	Acentua o sabor adocicado do malte, acima desse valor tornará o sabor salgado.
Cl <sup>-</sup>	Até 250	Acentua o sabor adocicado do malte quando combinado a Na <sup>+</sup> . Quando derivado do processo de tratamento de água, deve ser eliminado, pois resultará em aroma “medicinal” (clorofenol) na bebida.
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Até 44	Considerado um contaminante na água cervejeira. Durante a fermentação pode ser convertido a nitrito, o qual é tóxico às leveduras, interrompendo a fermentação.
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Até 3	Interrompe a fermentação por ser tóxica às leveduras. Sua ingestão é considerada tóxica para a maior parte dos animais.

Fonte: Adaptado de Coelho Neto et al (2020)

O malte é aquele que dará corpo a cerveja, obtido por meio do processo artificial e controlado de germinação da cevada ou de outros cereais, chamada malteação (ROSA; AFONSO, 2015, SILVA, 2017). Inicialmente, ocorre um aumento na umidade dos grãos por 3 a 4 dias a 16 °C, até o início da germinação, pois é quando conferirá enzimas necessárias para a quebra do amido em açúcares simples, por fim, o processo é interrompido e os grãos são torrados reduzindo a umidade e conservando o produto (COELHO NETO et al., 2020, JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009, SILVA 2017). Vale ressaltar, que o processo de torra varia de acordo com o estilo de bebida desejado, podendo ser uma cerveja mais escura ou mais clara, no

teor alcoólico da mesma e nos seus sabores (COELHO NETO et al., 2020, JACKSON, 2010, SILVA, 2017).

O lúpulo trata-se de um vegetal pertencente à ordem das *Rosales* e à família Cannabaceae possuindo diversas espécies, sendo as flores (Figura 1) não fertilizadas das plantas fêmeas do *Humulus lupulus* utilizado pela indústria cervejeira (ALMAGUER et al., 2014, WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018, TING; RYDER, 2017). Além das aplicações mencionadas, o lúpulo também é utilizado na medicina, pois contém atividades antimicrobianas, anti-inflamatórias, fitoestrogênicas e calmantes (ZAWADZIC et al., 2018, KOETTER; BIENDL, 2010). Estas mesmas atividades são encontradas na cerveja quando o lúpulo é adicionado, contribuindo também para que não haja oxidação e contaminação microbiológica da bebida (SCHONBERGER; KOSTELECKY, 2011).

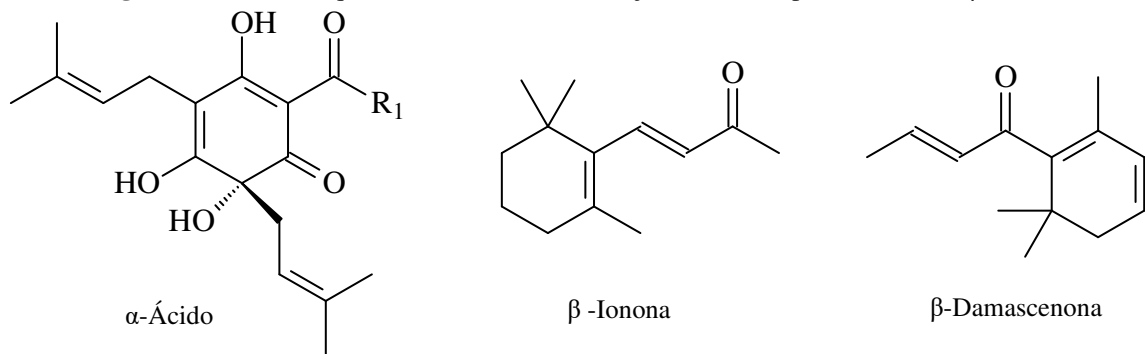
**Figura 1** - Flores do lúpulo utilizadas para a produção de cervejas.



Fonte: Silva (2017)

Nas flores da planta encontram-se glândulas de lupulina que contém um pó amarelo (lupulina) constituída majoritariamente de polifenóis,  $\alpha$ -ácidos e  $\beta$ -ácidos (Figura 2), resinas e óleo essencial, responsável pelas características sensoriais da cerveja que são o amargor e o aroma (COELHO NETO et al., 2020, JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009, SILVA, 2017, DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019). Outro fator importante a ser destacado é a estabilidade do sabor e a retenção da espuma que a planta confere na bebida (DRAGONE et al., 2007, SILVA; FARIA, 2008).

**Figura 2** - Estruturas químicas das substâncias majoritárias do lúpulo:  $\alpha$ -ácidos e  $\beta$ -ácidos.



Fonte: Adaptado de Coelho Neto et al (2020)

Para a fermentação utilizam-se leveduras que são microrganismos pertencentes à família dos fungos e possuem a capacidade de converter os açúcares simples, glicose e maltose, presentes no mosto em álcool e  $\text{CO}_2$ , gerando nesse processo subprodutos como ácidos orgânicos, cetonas e ésteres (COELHO NETO et al., 2020, JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009, SILVA, 2017). As leveduras utilizadas na indústria cervejeira são do gênero *Saccharomyces*, sendo as mais utilizadas as espécies *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* e *S. uvarum*, a primeira para cervejas de alta fermentação (*Ale*) e as duas últimas para baixa fermentação (*Lager*) (COELHO NETO et al., 2020, ROSA; AFONSO, 2015, SILVA, 2017). Os subprodutos que podem ser obtidos caracterizam também o perfil sensorial da bebida, como a presença de ésteres que contribuem com aromas frutados, e dependendo do tipo de levedura utilizada, as características organolépticas são alteradas em decorrência dos diferentes metabolismos (COELHO NETO et al., 2020, JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009).

Como o mercado cervejeiro é caracterizado por um público jovem entre 25 a 44 anos por consequência do baixo poder aquisitivo, existe uma necessidade de inovações tanto no sabor das bebidas quanto das embalagens (MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011). Dessa forma, a liberação da utilização de outros ingredientes possibilitou a obtenção de cervejas com características organolépticas únicas (DALLA SANTA et al., 2020), entretanto, há países que essa flexibilidade não é permitida, por esse motivo, existe uma grande fiscalização nessa área.

### 3.3 Processos de produção de cerveja

No Brasil, a produção de cervejas especiais tem estimulado o crescimento desse setor (DALLA SANTA et al., 2020), destarte, grande parte dos cervejeiros buscam adicionar adjuntos na sua produção a fim de incorporar a bebida um perfil sensorial mais enriquecido que possa se destacar e dessa forma, atrair consumidores que ainda não fazem o uso do produto, despertando a curiosidade e o interesse dos mesmos (FERREIRA et al., 2019). Com base nisso,

as cervejas podem ser classificadas em dois tipos de fermentação utilizada, *Ale* e *Larger*, e por meio delas a cerveja é subdividida (MELLO; DA SILVA, 2020) em vários estilos.

Outrossim, o artigo 36 da legislação brasileira de nº 9.902, de 8 de julho de 2019 (BRASIL, 2019) considera a cerveja como uma

bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro (BRASIL, 2019, p. 7).

O decreto ainda estabelece que na produção da bebida, alguns adjuntos tanto de origem vegetal quanto animal podem ser acrescentados, ficando como coadjuvante na fabricação da mesma (BRASIL, 2019). Portanto, para que seja produzida uma cerveja são necessários quatro ingredientes básicos (água, malte, lúpulo e levedura), os adjuntos entram para contribuir com o perfil da mesma, mas de forma reduzida.

É nessa perspectiva, que surgem diversos estilos de cerveja, que diferem formas de utilização dos insumos e adição de adjuntos, como por exemplo, Dalla Santa et al (2020) produziram uma cerveja com alcachofra a fim de contribuir à bebida benefícios à saúde durante o consumo. Do mesmo modo, Pimentel et al (2019), também buscaram enriquecer nutricionalmente através da adição de vitamina C por meio da introdução de camu-camu à bebida. Da Silva Sales e De Souza (2021), utilizaram o estilo *Catharina Sour*, de origem brasileira, para produzir uma bebida com características do fruto Araça-boi, trazendo aroma e acidez. Oliveira, Faber e Plata-Oviedo (2015), obtiveram êxito ao elaborar uma cerveja substituindo parcialmente o malte por mel, agregando valor ao produto e adquirindo uma bebida com um teor alcoólico maior que a convencional. Portanto, a prática de incorporar a cerveja diferentes ingredientes, como frutas e especiarias, é algo crescente no mercado e que vem chamando atenção de inúmeros consumidores.

Mas como que ocorre a produção dessa bebida? O processo de produção da bebida é realizado em etapas que são caracterizadas por moagem, mostura, fervura, fermentação, maturação, filtração e envase (COELHO NETO et al., 2020, ROSA; AFONSO, 2015, SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2009). Cada etapa possui uma significância e importância para a obtenção de uma cerveja de qualidade e estas podem ser conferidas na Figura 3.

Para o mundo cervejeiro a moagem do malte é uma etapa que deve ser feita com muita cautela, pois é preciso que os grãos do cereal sejam moídos de uma forma que ocorra a separação da casca e do endosperma do grão, ou seja, o moedor deve ser regulado para que a

moagem não fique muito fina, gerando problemas na filtração podendo obter inclusive *off-flavors*, ou muito grossa dificultando a conversão do amido em açúcares solúveis (COELHO NETO et al, 2020, SILVA, 2017). *Off-flavors* são, portanto, características indesejáveis da bebida, isto é, compostos químicos que podem ser produzidos devido há algum erro no procedimento, como mostra a tabela 2 (COELHO NETO et al., 2020).

**Figura 3** - Principais processos de produção de cerveja em ordem cronológica.



Fonte: Autora, 2022

**Tabela 2** - Compostos químicos encontrados na cerveja e off-flavour causado na bebida.

Substância	Concentração típica na cerveja (mg/L)	Limiar do sabor (mg/L)	Off-flavour
Ácido acético	30 a 200	175	Ácido, Vinagre
Ácido propanóico	1 a 5	150	Ácido, Vinagre e leite
Ácido pentanóico	0,03 a 0,1	8	Suor, odor do corpo
Ácido 2-metilbutanóico	0,1 a 0,5	2	Queijo, lúpulo velho, suor
Ácido sulfídrico	-	-	Sulfetos, ovos podres
3-metil-2-buten-1-tiol	0,001 a 0,1	0,01	Gambá, alho-poró
Butan-2,3-diona	0,01 a 0,4	0,07 a 0,15	Amanteigado, pipoca de cinema
Metanol	0,5 a 3,0	10.000	Alcoólico, solvente
2-metil butanol	8 a 30	65	Alcoólico, vinosa
Dimetilsulfureto	-	-	Legumes cozidos: milho em conserva ou repolho

Fonte: Adaptado de Coelho Neto et al (2020)

Posteriormente, o malte moído é colocado em água para aquecimento gradual por um período de tempo determinado de acordo com o tipo de estilo desejado, isso é chamado de brasagem ou mostura, é durante esse processo que será obtido o mosto, mistura líquida

açucarada, através da hidrólise do amido pelas enzimas do próprio grão (COELHO NETO et al., 2020, ROSA; AFONSO, 2015, SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2009). Quanto maior a torra dos grãos de malte, mais intensa será a cor do mosto (JACKSON, 2010). Vale ressaltar que, nessa etapa o pH, a temperatura e o tipo de água utilizada são parâmetros que interferirem na degradação do amido e de outras substâncias, ou seja, na eficiência do processo (JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009, SILVA, 2017). É nesse ponto da produção, que os adjuntos podem ser acrescentados.

Após a mostura completa, o mosto passará por uma fervura para que haja a esterificação, utilizando altas temperaturas e essas variaram de acordo com o estilo de cerveja a ser obtido (COELHO NETO et al., 2020). Durante a fervura, enzimas ainda ativas serão inativadas, alguns possíveis *off-flavors* poderão ser evaporados e serão formados compostos responsáveis pela cor e pelo sabor da cerveja por meio da reação de Maillard (COELHO NETO et al., 2020, SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2009). Nessa etapa serão adicionados o lúpulo que, em decorrência da elevada temperatura, os ácidos presentes na substância formarão isômeros *cis* e *trans*, obtendo assim iso- $\alpha$ -ácidos que darão amargor à bebida (COELHO NETO et al., 2020). Os lúpulos são divididos em duas categorias, os de amargor e os de aroma, que são adicionados em diferentes ocasiões, os primeiros no início da fervura, enquanto que os segundos no final desta etapa (COELHO NETO et al., 2020, SILVA, 2017).

O produto resultante passará por resfriamento para atingir a temperatura necessária que a levedura escolhida possa trabalhar, ocorrendo assim a sedimentação de partículas em suspensão e a aeração do mosto, conferindo ao mesmo, oxigênio necessário para a fermentação (COELHO NETO et al., 2020, JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009, SILVA, 2017, ROSA; AFONSO, 2015). Vale ressaltar que, segundo De Souza e Carvalho (2022), este é o único momento que o oxigênio deve estar presente, posteriormente, todo o contato com o oxigênio poderá ser prejudicial para a qualidade da bebida, podendo produzir *off-flavors*.

Na fermentação, a glicose que se encontra no mosto será oxidada a piruvato (glicólise) que sofrerá uma descarboxilação formando CO<sub>2</sub> com a ação da enzima piruvato descarboxilase, podendo ocorrer também a formação de acetaldeído devido a presença da coenzima tiamina pirofosfato (COELHO NETO et al., 2020). Esse processo deve ocorrer em tanques fechados que possuem apenas uma válvula para a saída do dióxido de carbono evitando contato com o ambiente (COELHO NETO et al., 2020). Essa etapa é demorada e sempre há um monitoramento para verificar se a fermentação se encerrou por meio de teste de densidade ou com o auxílio de um refratômetro. Esse estágio também pode acrescentar à bebida novos

sabores, principalmente porque durante a fermentação, além do etanol e do CO<sub>2</sub>, outros compostos podem ser gerados como subprodutos (SIQUEIRA; BOLINI; MACEDO, 2009).

Ao final da fermentação, a cerveja deve ser transferida para um tanque limpo, livre de leveduras e impurezas, sob temperatura controlada permanecendo por dias para que, as leveduras ativas ainda presentes, possam concluir o processo, livrando a bebida de possíveis compostos indesejáveis (COELHO NETO et al., 2020). Esse processo é chamado de maturação e o tempo de descanso pode variar com base no estilo adotado. Por fim, a cerveja é filtrada, carbonatada e envasada. O segundo significa adicionar à bebida uma quantidade extra de açúcares fermentáveis que irão provocar uma refermentação na garrafa, garantindo a mesma, espumas que manterão as características organolépticas da bebida (SILVA, 2017).

### **3.4 Aspectos nutricionais da bebida**

A cerveja é uma bebida rica em nutrientes, carboidratos, proteínas, vitaminas, aminoácidos, minerais, fibras e não possui gorduras (RODRIGUES et al., 2016, SILVA; LEITE; PAULA, 2016). Segundo Coimbra et al (2009), o consumo de 1 L dessa bebida garantirá o equivalente em carboidratos a 150 g de pão e em proteínas à 60 g de pão, 120 g de leite e 25 g de carne (COIMBRA et al., 2009, apud ROSA; AFONSO, 2015). Dependendo do adjunto acrescentado à bebida, a qualidade nutricional aumenta, como mostrou Pimentel et al (2019) ao inserir o fruto amazônico camu-camu à bebida, conferindo com vitamina C.

A adição de lúpulo na produção da bebida, além de garantir a qualidade sensorial da mesma, contribui introduzindo os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e calmantes da cerveja (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019). Segundo Lapčík et al (1998) e Kondo (2004) a cerveja possui uma série de nutrientes que auxiliam no combater ao câncer, justamente pela presença de substâncias químicas advindas do lúpulo e dos processos de produção. A ingestão da bebida pode contribuir para a inibição da osteoporose, da mesma forma, o consumo moderado de álcool pode reduzir o risco de diabetes e demência (KONDO, 2004).

### **3.5 O Kefir: benefícios e aplicações**

O uso do Kefir remete à antiguidade, desde que o homem introduziu em sua alimentação leite de origem animal, conservando-o em recipientes de cerâmica ou peles de animais e dessa forma, ocorria a fermentação e a durabilidade da bebida (DIAS et al., 2016). Sua origem pode estar relacionada ao norte das montanhas entre a Europa Oriental e a Ásia Ocidental, seu nome é de origem eslavo e significa “bem-estar” devido aos efeitos que o seu consumo causa (DERTLI; ÇON, 2017, EBNER et al., 2015, ROSA et al., 2017).

Este alimento se tornou popular entre as pessoas e por consequência disso, se disseminou por países como Estados Unidos, Japão, França e ao Brasil (FIORDA et al., 2017).

Como qualquer outro alimento, dependendo do lugar que é usufruído, possuirá outra denominação como quefir, tibicos, cogumelos tibetanos, plantas de iogurte, cogumelos do iogurte, kephir, kiaphur, kefer, knapon, kepi e kippi (KEMP, 1984).

Kefir, portanto, trata-se de uma bebida levemente ácida e alcoólica, nutricional e probiótica obtida por meio da fermentação de uma matriz líquida açucarada (LYNCH et al., 2021, SHARIFI et al., 2017), podendo ser leite ou água, com grãos. Estes grãos, tratam-se de massas gelatinosas irregulares de fungos e bactérias que vivem em simbiose (BRACCINI et al., 2021, ROSA et al., 2017), como bactérias do ácido láctico, do ácido acético, leveduras e bolores (POGAČIĆ et al., 2013, PURUTOĞLU et al., 2020).

Os grãos se alimentam dos carboidratos presentes no meio ao qual estão inseridos e por meio disso, produzem uma gama de compostos químicos que apresentam atividades benéficas para o organismo. Durante a fermentação, podem ser produzidos ácido láctico, peptídeos bioativos, exopolissacarídeos, antibióticos, etanol, dióxido de carbono, compostos aromáticos, diacetil, acetaldeído, aminoácidos (MA'MIN et al., 2018, ROSA et al., 2017, DE SAINZ et al., 2020, YILMAZ-ERSAN et al., 2018).

O Kefir pode ser lácteo e não lácteo, ou seja, pode ser obtido em uma matriz aquosa açucarada ou por meio do leite, na qual o segundo probiótico une às propriedades do leite com a fermentação (AZIZI et al., 2021). Entretanto, para intolerantes a lactose recomenda-se o consumo deste em água (FIORDA et al., 2017). Apesar de ambas as bebidas apresentarem uma cultura biológica muito semelhante, os produtos metabólicos assim como os subprodutos finais são divergentes, dependendo da fonte de carbono e energia disponível (FIORDA et al., 2017, FIORDA et al., 2016, HSIEH et al., 2012).

A legislação brasileira no decreto de nº 9.013 de 29 de março de 2017 art. 386 (BRASIL, 2017), considera que leites fermentados são

produtos lácteos ou produtos lácteos compostos obtidos por meio da coagulação e da diminuição do pH do leite ou do leite reconstituído por meio da fermentação láctea, mediante ação de cultivos de microrganismos específicos, com adição ou não de outros produtos lácteos ou de substâncias alimentícias (BRASIL, 2017, p. 51).

Portanto, é incluído na regulamentação iogurtes, leites fermentados ou cultivados, leites acidófilos, o kumys, a coalhada e o Kefir (BRASIL, 2017). Para a produção da bebida pode-se utilizar diferentes tipos de leite, como leite bovino, caprino e leites vegetais (BRACCINI et al., 2021), vale ressaltar que, segundo Gao e Li (2016), a composição química poderá variar conforme a composição biológica dos seus grãos e da matriz em que está inserida.

Os grãos podem ser reaproveitados sendo possível realizar sucessivas fermentações por meio do chamado *back-slopping*, que simplesmente é um método que consiste na retirada dos microorganismos de uma matriz fermentada para uma nova (LYNCH et al., 2021). Os mesmos podem ser armazenados de diferentes formas, mas o mais recomendado que irá garantir uma melhor preservação da cultura biológica é o congelamento a -20 °C, podendo permanecer por anos (GARROTE; ABRAHAM; ANTONI, 1997, ROSA et al., 2017).

Para a fermentação dos grãos, o tempo e a temperatura são parâmetros importantes que influenciam nas características físico-químicas e microbiológicas do produto final (LIMA; DO NASCIMENTO; DE FARIAS, 2019). Segundo, Lima, Do Nascimento e De Farias (2019), quanto maior o tempo de fermentação maior o consumo de lactose, dessa forma, haverá maior produção de ácido láctico resultando em um produto mais azedo e se a temperatura for superior a 25 °C, poderá haver contaminação por outros microorganismos. De acordo com os autores 25 °C e 24 horas foram os parâmetros mais adequados para que seja possível obter boas concentrações de bactérias lácticas e de acidez desejável (LIMA; DO NASCIMENTO; DE FARIAS, 2019).

Consumir essa bebida fermentada diariamente pode trazer inúmeros benefícios à saúde, como por exemplo: Vinderola et al (2005), mostram que o sistema imune pode sofrer uma estimulação; Rodrigues et al (2005) apresentam uma atividade antimicrobiana contra patógenos; Marquina et al (2002) apresentam uma melhoria no equilíbrio da microbiota intestinal; Dias et al (2016) trouxe em seu trabalho ação do Kefir contra tumores. Vale ressaltar que, a utilização do Kefir tem sido recomendada para o tratamento de várias doenças, como o câncer (RANDAZZO et al., 2016, SHARIFI et al., 2017) e também como anti-hipertensivo (BRASIL et al., 2018, EBNER et al., 2015).

Como mencionado, a composição química da bebida pode variar de acordo com a matriz a qual está inserida. Segundo Garrote, Abraham, Antoni (1997) e Sharifi et al (2017), o Kefir possui cerca de aproximadamente 90% de umidade, 6% de açúcares, 3,5% de gorduras e 3% de proteínas. Estas por sua vez, se tornam mais facilmente aceitas pelo organismo humano pela ação da coagulação ácida e da proteólise presente (ROSA et al., 2017).

De acordo com Liutkevičius, Šarkinas (2004) e Sharifi et al (2017), o leite fermentado apresenta uma concentração mais elevada de aminoácidos do que o leite não fermentado, exemplos desses compostos são Lisina, isoleucina, fenilalanina, valina, treonina, metionina e triptofano. O mesmo também é rico em vitaminas e minerais (SHARIFI et al., 2017) e por meio dele é possível obter derivados, como queijo, iogurte e outros produtos.

### **3.6 Uma nova cerveja fermentada por Kefir**

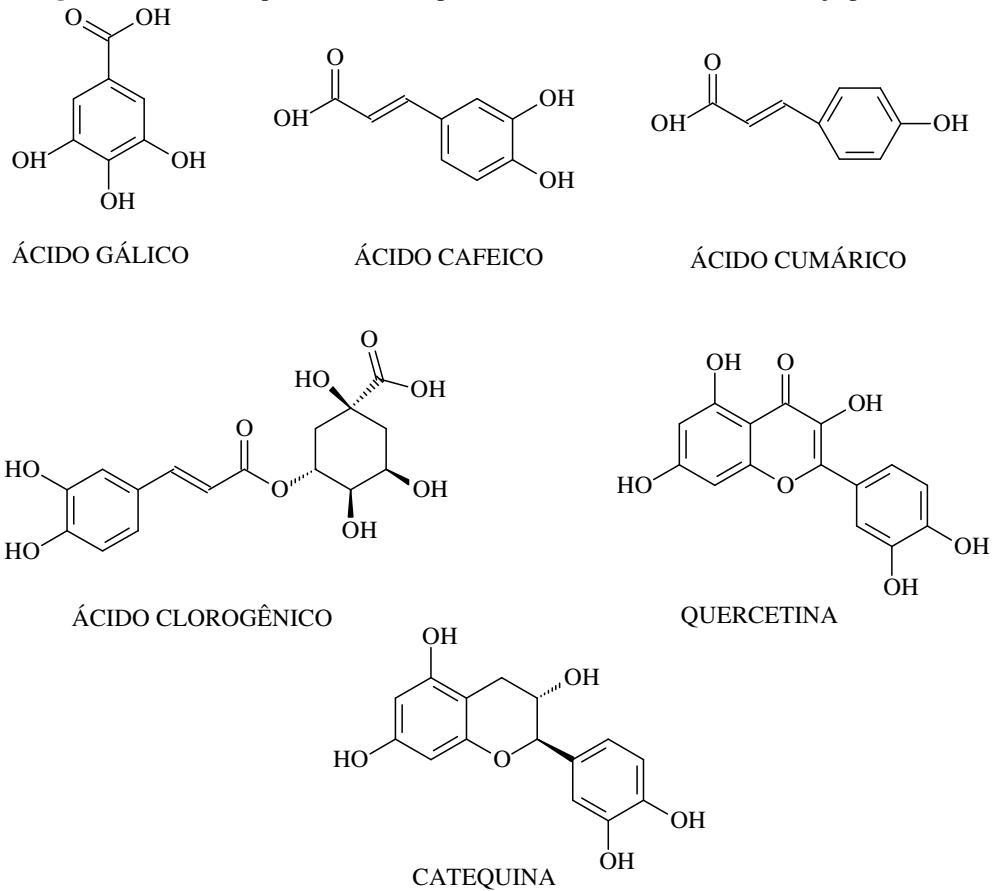
Como apresentado, tanto a cerveja quanto o Kefir possuem uma composição química que confere ao organismo humano efeitos benéficos à saúde. Dessa forma, Rodrigues et al (2016) buscou combinar as atividades dessas duas bebidas elaborando assim uma cerveja fermentada unicamente por Kefir que possuiria características probióticas e efeitos à saúde acrescidos, introduzindo assim um alimento funcional alcoólico à dieta humana.

Para atingir o objetivo, foi necessário que os grãos de Kefir fossem adaptados em uma mistura de água com açúcar mascavo para sobreviver no mosto da cerveja (RODRIGUES et al., 2016). Toda a produção da bebida foi realizada através de uma adaptação do processo de Venturini Filho (2010) para 20 L de cerveja.

Para comprovar a eficácia do produto final, os autores testaram as atividades da cerveja em ratos que possuíam úlceras estomacais e edema na pata, após o tratamento, verificaram que que todos aqueles que haviam sido tratados com cerveja de Kefir, apresentavam uma diminuição na inflamação e nas úlceras quando comparado com outros tratamentos (RODRIGUES et al., 2016). Essas atividades estão associadas aos compostos químicos que foram formados durante a produção da bebida.

Grande parte desses compostos são substâncias fenólicas que possuem origem vegetal (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007) que provém do lúpulo ou do malte (SILVA et al., 2021) e a presença deles conferiram as propriedades bioativas, antioxidantes, anti-inflamatório, antidiabético, atividades estrogênicas, nutritivas e aromáticas da bebida (MARQUES et al., 2017, OSORIO-PAZ; BRUNAUER; ALAVEZ, 2020, SILVA et al., 2021). Quando associados ao Kefir, essas atividades poderão ser potencializadas.

Para verificar a composição fenólica da cerveja probiótica, Rodrigues et al (2016) analisou as amostras por cromatografia líquida comparando os tempos de retenção e os espectros de UV de cada pico gerado com os padrões injetados nas mesmas condições. Para análise dos compostos fenólicos seguiram o proposto por Nardini et al (2006) utilizando quercetina, catequina, ácido gálico, cafeico, cumárico e clorogênico como padrões (Figura 4). Os resultados mostraram não haver tanta distinção no teor de polifenóis (Tabela 3) entre a cerveja com Kefir e a de controle, entretanto a combinação desses com os efeitos pré e probiótico do Kefir teriam ocasionado nas atividades anti-inflamatórias e antiulcerogênicas observadas (RODRIGUES et al., 2016).

**Figura 4** - Estrutura química dos compostos fenólicos analisados na cerveja probiótica.

Fonte: Autora, 2022

**Tabela 3** - Polifenóis encontrados nas cervejas de controle e Kefir expressos como média  $\pm$  desvio padrão de seis medidas obtidas com 0, 10, 20, 30, 60 e 120 dias após a envase das bebidas.

POLIFENÓIS	CERVEJAS (mg/L)	
	Controle	Kefir
Ácido cafeico	23,1 $\pm$ 6,0	25,1 $\pm$ 5,9
Ácido clorogênico	537,1 $\pm$ 63,2	409 $\pm$ 17,3
Ácido cumárico	51,4 $\pm$ 16,4	44,5 $\pm$ 4,0
Ácido gálico	655,4 $\pm$ 211,0	555,1 $\pm$ 22,6
Catequina	459,6 $\pm$ 10,1	501,6 $\pm$ 52,5
Quercetina	18,3 $\pm$ 7,2	21,6 $\pm$ 6,6

Fonte: Adaptado de Rodrigues et al (2016)

### 3.7 Análises: extração, separação e detecção

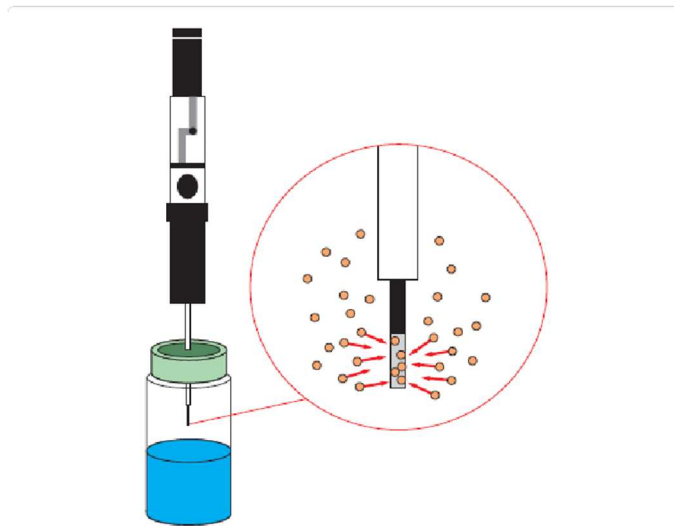
Para garantir a qualidade dos produtos a cromatografia pode ser utilizada e por ela é possível analisar as amostras, detectar, identificar e quantificar compostos. O método consiste em um processo de separação baseado em diferentes interações moleculares das substâncias presentes nas amostras e as fases empregadas na técnica (estacionária e móvel) (SERAFIM, 2018). Por meio dela, é possível estudar o perfil químico de bebidas e aliado a espectrometria,

esse método torna-se mais eficiente (DENNENLOHR et al., 2020, MEURER, 2020, RUI-AUMATELL et al., 2014).

Essa possibilidade de acoplamento combina a capacidade de separação de uma com a possibilidade de se obter informações sobre o composto químico em estudo (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008, SERAFIM, 2018). Os métodos cromatográficos são classificados de acordo com o suporte empregado (planar ou de coluna) e subdividindo em cromatografia de papel, delgada, líquida, gasosa ou supercrítica (SERAFIM, 2018), do mesmo modo a espectroscopia também pode ser classificada de acordo com o tipo de detector, podendo ser de massas, UV-VIS, infravermelho e outros.

Antes de realizar qualquer análise nos equipamentos é preciso preparar as amostras de acordo com um método analítico que se encaixe nos objetivos a serem alcançados, como por exemplo, a SPME. Esta possui uma alta confiabilidade para a análise de compostos voláteis devido a sua sensibilidade e por não utilizar solventes nas extrações dos compostos (KATAOKA; SENHOR; PAWLISZYN, 2000). É um método extremamente simples, rápido e barato (BATOOL et al., 2020) e ao utilizar essa extração no modo *headspace* (HS), a fibra é exposta diretamente na amostra (Figura 5), mais especificamente no ar que envolve a mesma e que conterá os compostos voláteis (SCHMIDT; PODMORE, 2015).

**Figura 5** - Representação da microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME).



Fonte: Schmidt e Podmore (2015)

Outro método analítico que pode ser utilizado é a SPE que também é bastante utilizada para preparo de amostras e extração de compostos. Segundo Barrionuevo e Lanças (2001) nesse processo ocorre a extração dos analitos e compostos interferentes presentes na matriz aquosa por meio de um cartucho contendo um solvente específico. A priori o cartucho é ativado com um solvente orgânico afim de remover os interferentes e posteriormente outro solvente para

lavar os analitos (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001). A SPE trata-se de uma técnica clássica, prática e com bastante sensibilidade, entretanto, a etapa de dessorção dos compostos presentes no cartucho necessita de um solvente que geralmente é tóxico (BARRIONUEVO; LANÇAS, 2001).

Essas técnicas são muito empregadas em indústrias petroquímicas, veterinárias, farmacêuticas, alimentícias, laboratórios de análises clínicas, forense, cosméticas e outras (SERAFIM, 2018). Nas cervejarias, são utilizadas para analisar os subprodutos gerados durante o processo de fabricação da bebida e da fermentação, como aldeídos e cetonas (DENNENLOHR et al., 2020). Segundo Rui-Aumatell et al (2014), mais de 1000 compostos já foram identificados e relatados durante as análises de cervejas, compostos esses que são provenientes das diversas matérias primas da bebida.

Álcoois, ésteres, ácidos orgânicos, cetonas, hidrocarbonetos, éteres e outros são exemplos de compostos encontrados nas cervejas (ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2014, CHARRY-PARRA; JESUS-ECHEVARRIA; PEREZ, 2011, MOREIRA et al., 2013, RUI-AUMATELL et al., 2014). Martins et al (2018) traz em seu trabalho, pesquisas de diversos autores que relataram que em torno de 80 compostos terpênicos já foram identificados nas análises da composição volátil da bebida, como por exemplo o  $\gamma$ -mirceno,  $\gamma$ -cariofileno e compostos oxigenados como linalol,  $\gamma$ -citronelol, nerol e outros.

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1 Período de execução do trabalho**

Toda a parte experimental do trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Cromatografia (LabCrom) do curso de Licenciatura em Química da Universidade Federal do Norte do Tocantins (UFNT), campus CCI de Araguaína – TO, com exceção da produção das cervejas que foi realizada em domicílio por conta das limitações do laboratório em relação ao processo de mosturação e fervura. O trabalho foi duradouro, permeando os anos de 2020 e 2022.

### **4.2 Cultivo e análise do Kefir**

#### **4.2.1 O Kefir: cultivo**

Os grãos foram obtidos por doação através de uma médica veterinária (Figura 6) e armazenados no frízer em  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  no LabCrom até o período das análises. Logo após, foram descongelados e reativados fermentando-os até 48 h em um frasco com uma porção de leite UHT, vedado por gaze (figura 7a) seguindo a metodologia tradicional de cultivo dos grãos. Posteriormente, após a segunda fermentação, os grãos foram lavados com água e submetidos a fermentação para extração dos compostos por HS-SPME e análise no GC-MS no LabCrom.

**Figura 6** - Grãos de Kefir cultivados no leite.



Fonte: Autora, 2022

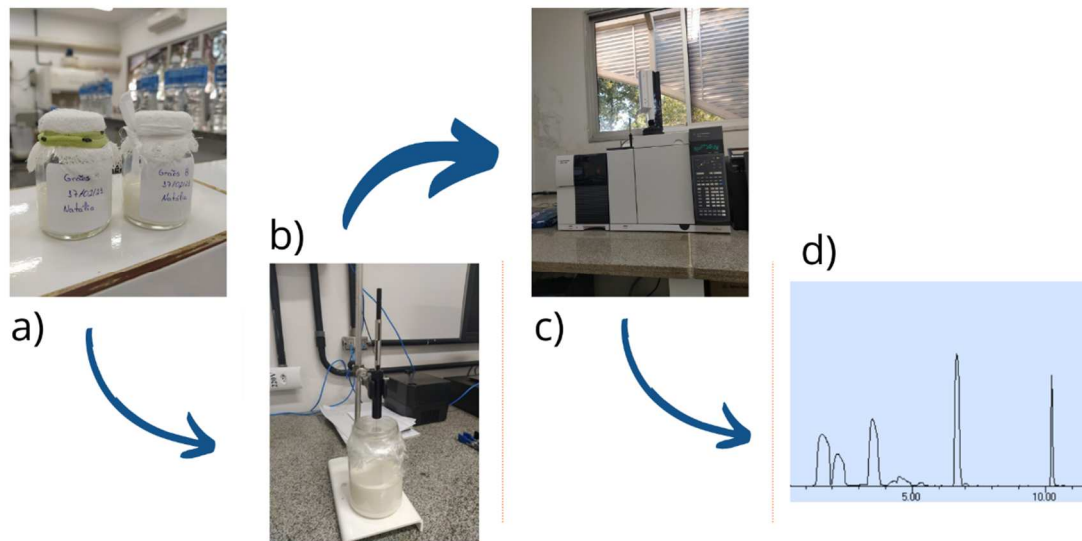
#### 4.2.2 Microextração em fase sólida

Para o preparo das amostras foi utilizado o método HS-SPME para extrair os compostos voláteis sob diferentes condições de extração como tempo, temperatura e fibras. Foi utilizado o conjunto de fibras da Supelco de 65  $\mu\text{m}$  de Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB), 100  $\mu\text{m}$  de Polidimetilsiloxano (PDMS) e 75  $\mu\text{m}$  de Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS). As mesmas foram condicionadas segundo as instruções da empresa fabricante, a PDMS/DVB 30 min, PDMS 30 min e CAR/PDMS 30 min. Frascos de penicilina de 20mL e *vials* foram usados como HS.

#### 4.2.3 Preparação do material, otimização do método de análise e extração

A priori, o frasco contendo os grãos de Kefir e o leite, foram colocados para fermentar em temperatura ambiente. Com 24 h de fermentação, o frasco foi vedado com plástico filme para maior concentração e extração dos compostos. Na primeira avaliação do perfil volátil, foi utilizada a fibra vermelha PDMS, exposta por um período de 20 min à temperatura ambiente, logo após, foi retraída e submetida a dessorção térmica diretamente na porta do injetor do cromatógrafo (figura 7).

**Figura 7** - Sequência metodológica da análise do Kefir: a) fermentação; b) extração dos voláteis; c) análise no GC-MS; d) identificação dos compostos.



Fonte: Autora, 2022

Após 48 h, realizou-se novamente a extração para comparação da evolução da fermentação e obtenção de um perfil inicial do Kefir. A segunda avaliação, foi feita com a utilização da fibra azul (PDMS/DVB) com as mesmas condições de extração e análise, variando no tempo de extração entre 20 e 55 min. A análise do leite puro também foi realizada, sob as mesmas condições por PDMS/DVB, para obter conhecimento de quais compostos estavam presentes no mesmo e quais surgiram após a fermentação.

Para obtenção de outros padrões, o *headspace* foi reduzido para *vials*. Os grãos foram cultivados normalmente no frasco, entretanto, para a extração em 24 e 48 h, foi retirada uma alíquota de 300  $\mu\text{L}$  do Kefir e colocada no *vial*, no qual as fibras foram expostas em tempos de 20, 50 e 55 min. A temperatura de fermentação foi controlada, utilizando para isso uma chapa aquecedora em 50  $^{\circ}\text{C}$ . Vale ressaltar, que durante esse processo de otimização, a fibra preta (CAR/PDMS) foi testada para meio de comparação com os mesmos parâmetros de análise que as fibras anteriores, com um tempo de extração de 50 min.

#### 4.2.4 Análise via GC-MS

As amostras foram analisadas em um Cromatógrafo a Gás Agilent Technologies 7890B, hifenizado a um espectrômetro de massas 5977B. O cromatógrafo operou com colunas capilares HP-5MS (5% Fenil Metil Siloxano), L = 30 m, DI = 0,25 mm e filme = 0,25  $\mu\text{m}$  e o gás de arraste utilizado foi o Hélio (99.999%) com fluxo de 1,2 mL/min. O GC-MS foi empregado com temperatura do injetor em 270  $^{\circ}\text{C}$ , da linha de transferência em 250  $^{\circ}\text{C}$ , do quadrupolo em 150  $^{\circ}\text{C}$  e da fonte 230  $^{\circ}\text{C}$ , com o fluxo da purga em 100 mL/min.

O modo de análise foi o *Splitless* em modo *scan* de varredura de 40 Da até 500 Da. O programa de temperatura do forno do GC foi definido inicialmente em 40 °C por 2 min e aumentou em 5 °C por minuto até 170 °C, seguindo por um adicional de 25 °C por minuto até 270 °C, que foi mantido em isoterma por 3 minutos. No total as corridas duraram 35 minutos.

### 4.3 Produção das bebidas

#### 4.3.1 Insumos cervejeiros

Foi utilizado três maltes para a composição da bebida, 2 Kg de Pale Ale (Agrária), 5 Kg de Pilsen (Agrária) e 400 g de Chateau Special B, sendo os dois primeiros os maltes base que possuem um maior poder enzimático para a conversão dos amidos e compõem quase 100% da bebida. O último trata-se de um malte especial que dará à bebida características únicas principalmente por ter sido exposto a altas temperaturas dando cor mais escura, sabor mais denso e corpo a mesma (SILVA, 2017).

Para temperar a cerveja e dar amargor e aromas característicos foi utilizado 75 g do lúpulo *Hallertau Tradition* e para a fermentação foi usada a levedura Safale American US-05 do gênero *Saccharomyces cerevisiae* que possibilitará uma fermentação do tipo *Ale* e 30 g de grãos de Kefir obtidos por doação. Por último, foi usada 20 L de água mineral comercial Jalapão.

#### 4.3.2 Processo de produção das bebidas

De acordo com Rodrigues (2016) a moagem ideal visa quebrar o grão expondo o endosperma e mantendo a casca intacta, onde a mesma servirá como um filtro para o malte, retendo grande parte dos resíduos da mosturação. Dessa forma, os grãos de malte foram adicionados em um moinho da Amantes da Breja modelo 2RM-Master e moídos aos poucos até que chegasse ao ponto ideal, que segundo Silva (2017) é preciso buscar um meio termo entre a moagem fina e a grossa.

Para a mosturação (figura 8), foi aquecido 15 L de água à 69 °C, logo após, o malte moído foi adicionado para a obtenção do mosto. Durante esse processo, as enzimas responsáveis pela quebra do amido são ativadas, entre elas a beta-amilase, alfa-amilase e a limite-dextrinase, que são diretamente influenciadas pela temperatura e pH da água (COELHO NETO et al., 2020, SILVA 2017). Houve, portanto, a necessidade de corrigir o pH da água com duas gotas de ácido láctico, deixando-o em torno de 5,5 por conta da sua composição química (Tabela X). O teste de iodo (figura 9) foi feito em várias etapas da mosturação para avaliar se a conversão dos amidos em açúcares já havia encerrado, já que a má conversão pode afetar diretamente o perfil químico da cerveja. Ao final do processo, 100 mL do mosto foi retirado e

resfriado a 20 °C para medir a densidade com o auxílio de um densímetro e avaliar o grau brix inicial.

**Figura 8** - Processo de mosturação e seus equipamentos

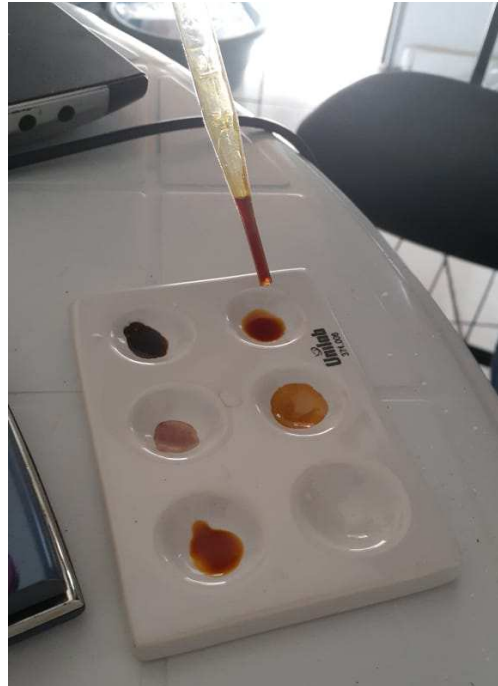


Fonte: Autora, 2022

**Tabela 4** - Composição Química da água mineral comercial Jalapão e características Físico-Químicas da mesma.

Composição Química	Concentração (mg/L)
Bário	0,13
Cálcio	16,28
Estrôncio	0,117
Lítio	0,017
Magnésio	5,759
Potássio	12,29
Sódio	3,609
Nitrato	0,04
Sulfato	2,27
Fluoreto	0,29
Cloreto	0,42
Bicarbonato	102,83
Borato	0,122

**Figura 9** - Teste de iodo realizado na etapa da mostura.



Fonte: Autora, 2022

Logo após, o bagaço que decantou na panela serviu como um filtro natural para o mosto que foi direcionado para a panela de fervura para dar continuidade na próxima etapa. O bagaço restante passou por um processo de lavagem para extrair todos os açúcares residuais ainda presentes, melhorando a eficiência. Nessa etapa foram despejados os 5 L de água restantes. Já na panela de fervura, o mosto permaneceu na mesma por cerca de 1h30 em temperatura aproximada de 68 °C, durante o processo foi adicionado o lúpulo de amargor no início para conferir a máxima extração dos alfa-ácidos como propôs Rodrigues (2016).

Ao final da etapa, o fogo foi desligado e o mosto mantido em repouso para resfriamento, *Whirlpool*, para que o líquido açucarado pudesse interromper a produção de compostos voláteis indesejáveis. Para isso, foram utilizadas três barras de gelo que foram colocadas em uma panela, e com o auxílio de um chiller (figura 10), foi possível realizar a troca de calor entre o mosto quente e a água fria, resfriando o líquido e ajudando na sedimentação de alguns compostos, reduzindo a turbidez do mesmo.

**Figura 10** - Resfriamento do mosto



Fonte: Autora, 2022

Para atuar como fermentador, foi utilizado os garrações da água mineral, na qual o mosto frio foi transferido para eles e oxigenado com uma bomba de aquário criando meios para a reprodução dos fermentos. Para obter métodos comparativos de análise, o líquido produzido foi dividido em 6 garrações, colocando 2,5L em cada, no qual quatro deles foram para fermentação em temperatura controlada à 19 °C, dois com Kefir e dois com levedura cervejeira. E para fermentação em temperatura ambiente do laboratório foi separado dois garrações com Kefir. Vale ressaltar, que a levedura foi previamente hidratada e a temperatura da geladeira controlada com o auxílio de um termostato.

Para fechar os garrações e possibilitar a saída de CO<sub>2</sub>, as tampas foram adaptadas com mangueiras (figura 11) que foram imersas em um copo com solução de iodo, para evitar contato da bebida com oxigênio evitando assim contaminação e oxidação, os fermentadores ficaram por uma semana e meia em 19 °C e os em temperatura ambiente à 22 °C. Para avaliar o processo de fermentação, foi utilizado um refratômetro para medir o grau brix.

**Figura 11** - Garrafões adaptados com mangueiras para evitar oxidação da bebida.



Fonte: Autora, 2022

Após o período de fermentação, o mosto foi transferido para novos garrafões para a retirada dos resíduos sedimentados e para dar entrada na etapa de maturação, na qual permaneceram em 1 °C por 5 dias com a regulação do termostato, esse processo segundo Coelho Neto et al (2020), é um método eficaz de remoção de compostos indesejáveis e de acordo com Silva (2017), deixar a bebida mais límpida com a floculação de um maior número de leveduras ainda presentes.

Por fim, a cerveja foi transferida cuidadosamente para um recipiente onde foi adicionado um xarope de açúcar invertido, chamado de *priming*, que serve para carbonatar e dar espuma a bebida, forçando as leveduras ainda presentes a refermentação (RODRIGUES, 2016) e posteriormente, transferido para garrafas (figura 12), previamente esterilizadas, que foram vedadas com um arrolhador manual e colocadas para permanecerem em envase por 10 dias à 20 °C. Posteriormente, a temperatura foi reduzida para 0 °C.

**Figura 12** - Envase das cervejas

Fonte: Autora, 2022

#### **4.4 Análise das cervejas**

##### **4.4.1 SPME e análise por GC-MS**

Foi utilizado a SPME para extrair os compostos voláteis por meio da fibra Supelco de 65 µm de PDMS/DVB, o qual foi condicionada segundo as instruções da empresa fabricante. *Vials* de 1,5 ml foram usados como HS. Para análise foi retirado uma alíquota de 300 µl de cada cerveja e colocadas nos *vials*, a fibra foi exposta por 30 min, logo após foi retraída e submetida a dessorção térmica diretamente na porta do injetor do cromatógrafo. As análises seguiram as mesmas condições cromatográficas do Kefir, como dito anteriormente.

##### **4.4.2 Extração em fase sólida e análise por HPLC-DAD**

Para o preparo das amostras e análise do perfil metabólico, a extração em fase sólida (Solid-phase extraction – SPE) foi realizada com um cartucho da Chromabond® C18 ec 6 mL/500 mg, no qual o mesmo foi devidamente ativado com 6 mL de metanol da Honeywell grau HPLC, gradiente 99,9%. 6mL de água deionizada foi adicionada e posteriormente 6 mL de cerveja foi acrescentado, na sequência os reagentes, acetato de etila (6 mL), diclorometano (6 mL), hexano (6 mL) e por fim 2 x 6 mL metanol para extrair os compostos ainda retidos no cartucho (Figura 13). Para cada etapa, foi recolhida as amostras para posterior injeção no equipamento cromatográfico. A extração foi realizada em triplicata para cada amostra de cerveja com o auxílio de uma bomba de pressão à uma vazão de 3,5 mL/min de ar.

**Figura 13** - Extração em fase sólida com o auxílio de uma bomba de pressão.



Fonte: Autora, 2022

Foi utilizado um cromatógrafo a líquido da Shimadzu 20 at contendo uma bomba SPD-M20A, degaseificador da fase móvel DGU-20A5R, coluna Shim-pack VP-ODS C18 nas dimensões de 150 L x 4,6 e um detector de arranjo de diodos (DAD) (figura 14). Para as análises foi utilizado um sistema de gradiente que se compõe de uma fase móvel com dois solventes sendo A, água deionizada e B, metanol grau HPLC 99,9%, com uma vazão de 1,00 mL/min, variando de 5% a 50% de B (0 a 10 min), 50% a 100% de B (10 a 30 min) mantendo em condição isocrática até 40 min, de 100% a 5% de B (40 a 45 min), mantendo os 5% até 55 min. As análises foram feitas com uma varredura de 220 a 780 nm usando as duas lâmpadas de deutério e tungstênio (D2W) e 30  $\mu$ L de cada amostra obtida na SPE foram injetadas.

**Figura 14** – HPLC-DAD do LabCrom da UFNT.



Fonte: Autora, 2022

#### 4.4.3 Análise dos compostos metabólicos - Flavonóides

Para analisar a composição metabólica das bebidas utilizou-se a metodologia de Silva et al (2021) com algumas otimizações, na qual utiliza um método simples para detectar substâncias fenólicas, em especial os flavonóides. Os padrões utilizados para as análises foram rutina e quercetina, estes foram devidamente preparados em solução de metanol a uma concentração de 0,1 mg/mL e foram utilizadas nesta etapa somente as frações das cervejas em metanol e água obtida por SPE.

Nessa etapa de pesquisa, foi utilizado um sistema de gradiente que se compõe de uma fase móvel com dois solventes sendo A, ácido acético 1% e B, acetonitrila grau HPLC 99,9%, com uma vazão de 1,00 mL/min, variando de 5% a 100% de B (0 a 35 min) permanecendo em condição isocrática por 5 min (40 min), posteriormente, de 100% a 5% de B (40 a 45 min), mantendo os 5% até 50 min. Usou-se uma varredura de 220 a 780 nm usando as duas lâmpadas de deutério e tungstênio (D2W). 30 µL de cada fração foi inserida no HPLC assim como as amostras padrões dos flavonóides.

#### 4.4.4 Análise estatística multivariada

A partir dos valores das concentrações relativas dos compostos voláteis identificados em todas as amostras de cerveja, foi gerado uma tabela em Excel® para processar essa matriz de dados na qual foi convertida para o formato de “.csv” para análise estatísticas: Análise de Agrupamento Hierárquico, (HCA - *Hierarchical Cluster Analysis*) e Análise de Componentes Principais, (PCA - *Principal Component Analysis*) e Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA - *Partial Least Squares Discriminant Analysis*). Ambas foram determinadas por operações matemáticas com o auxílio do *software online* MetaboAlnalyst® 5.0 na qual gerou representações gráficas para computar a matriz de dados gerados e assim determinar a variância.

### 4.5 Identificação dos compostos

Os espectros de massa dos compostos voláteis obtidos tanto nos cromatogramas das amostras do Kefir quanto das cervejas, foram analisados em software da Agilent, MSD ChemStation F.01.03.2357 e comparados com espectros das bibliotecas: NIST 2014, NIST WEBBOOK e Adams (2017), juntamente com o índice de similaridade. Os índices de retenção (IR) foram determinados utilizando uma série homóloga de n-alcenos, C7 a C30, injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, utilizando a equação 1 de Van den Dool e Kratz (1963).

$$IR = 100i \left( \frac{TRx-TRha}{TRhd-TRha} \right) + 100N \text{ (Equação 1)}$$

Para calcular o índice pela equação acima é necessário o tempo de retenção do composto (TRx), o tempo de retenção do alcano que elui antes do composto (TRha), do tempo de retenção do alcano que elui depois (TRhd), da diferença entre o número de carbono que elui antes e depois (i) e do número de carbonos do alcano que elui antes (N).

Para a identificação dos flavonóides, rutina e quercetina, utilizou-se a comparação dos espectros de absorção no UV e o tempo de retenção das amostras padrão com as das cervejas analisadas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Cultivo e produção do Kefir, análise e identificação dos produtos de fermentação

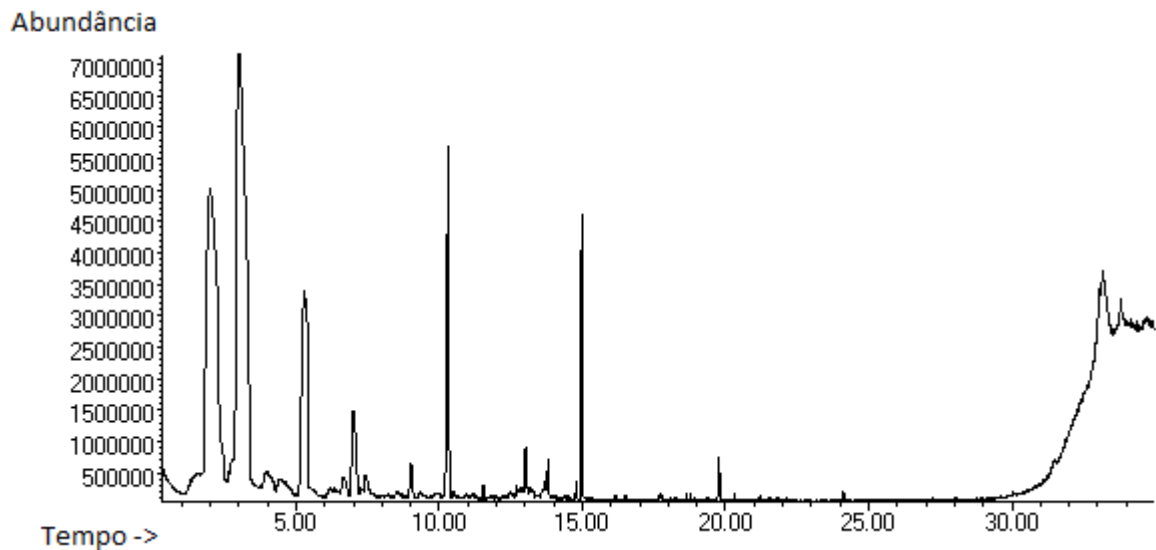
A SPME se mostrou promissora para análise dos compostos voláteis obtidos durante e após a fermentação do Kefir, entretanto, houve a necessidade de otimização no método de extração. Com base nisso, alguns parâmetros foram aprimorados, entre eles, mudança do HS, da fibra e do tempo de exposição, temperatura de fermentação e modo de análise. As otimizações foram realizadas de forma univariada, avaliando um parâmetro por vez.

Observou-se, que para obter melhores resultados, o frasco utilizado para a produção do Kefir serviria melhor como HS por conter todos os compostos desde o início da fermentação, ao contrário do *vial*, que mesmo com uma alíquota da bebida, apresentou cromatogramas com picos menos intensos. Além disso, a fibra PDMS/DVB apresentou melhores resultados na extração, em relação às demais fibras estudadas, por apresentar melhor definição e resolução das bandas cromatográficas, assim como mostrou Aghlara et al (2009), na qual usaram diversas fibras para extrair compostos em diferentes matrizes.

Em relação ao tempo de extração, apenas 20 min foi possível obter resultados significativos, entretanto, analisou-se que com 50 min de exposição, a fibra captou melhor os compostos (figura 15 e 16), dessa forma, o equipamento detectou sinais mais intensos, melhorando assim as identificações. Outro fator relevante que contribuiu para os estudos foi a duração do período de fermentação, pois, quando comparado o Kefir fermentado por 24 h com o de 48 h, os resultados do segundo foram melhores. Da mesma forma, quando submetido ao aumento de temperatura para 38 °C, os grãos fermentavam com mais eficiência, o que segundo Lima, Do Nascimento e De Farias (2019), o calor auxilia no metabolismo desses microrganismos. Uma evidência disso é o aumento da acidez do produto observada, pois, quanto maior o período de fermentação e temperatura, maior será o consumo de lactose,

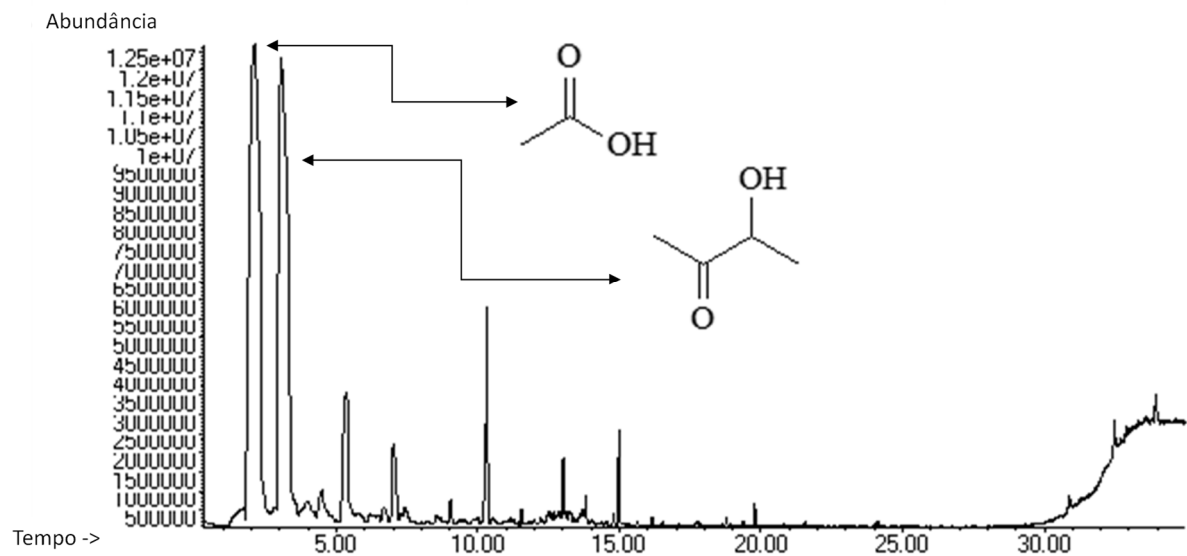
portanto, maior produção de ácido láctico (LIMA; DO NASCIMENTO; DE FARIAS, 2019) e outros subprodutos.

**Figura 15** - Cromatograma de íons totais dos voláteis do Kefir fermentado por 24 h com tempo de extração de 20 min.



Fonte: Autora, 2022

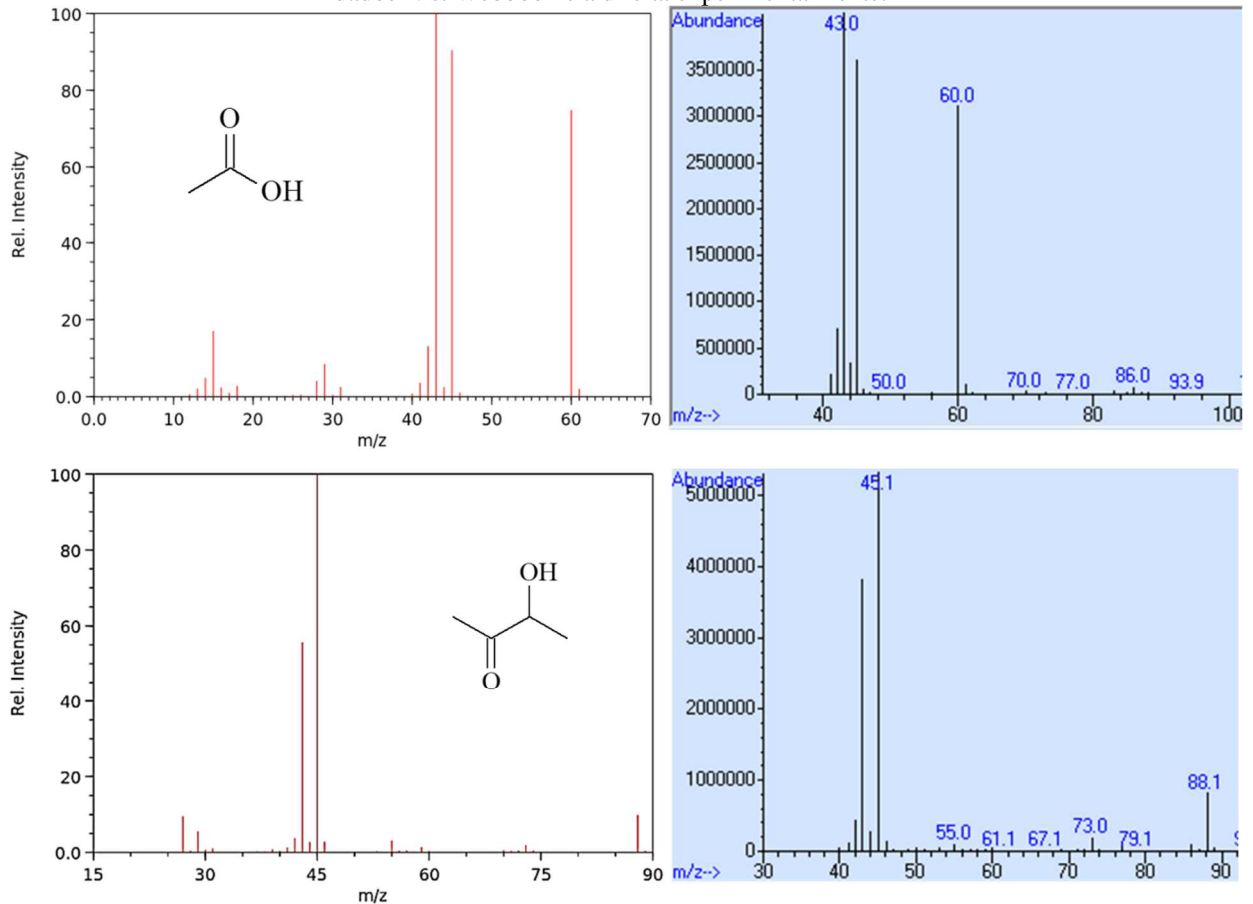
**Figura 16** - Cromatograma de íons totais dos voláteis do Kefir fermentado em 48 h com tempo de extração de 55 min.



Fonte: Autora, 2022

Com base nas otimizações realizadas, foi possível realizar uma análise semi pura obtendo cromatogramas com picos definidos, apesar de alguns pequenos interferentes da fibra. Analisando o perfil cromatográfico das amostras, nota-se a presença de dois picos majoritários e ao realizar as identificações por meio da comparação dos espectros com o banco de dados (Figura 17) e com o índice de retenção, constatou-se que os sinais analíticos tratavam-se respectivamente do ácido acético e da acetoina.

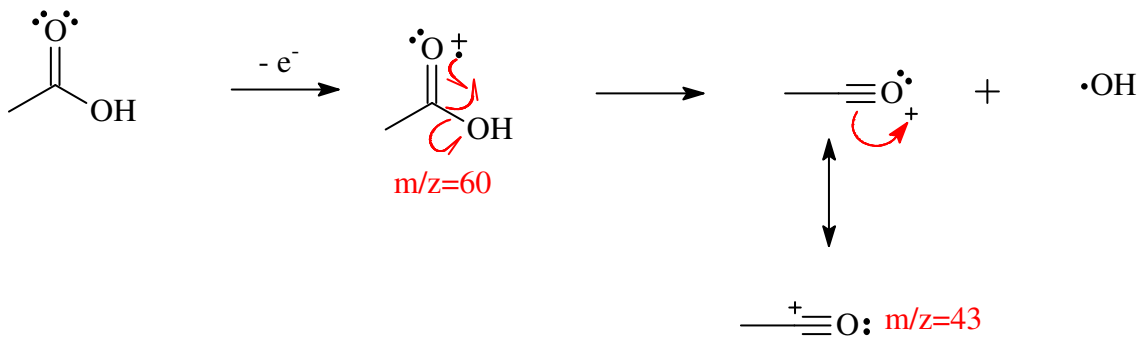
**Figura 17** - Espectro de massa do ácido acético (acima) e da acetoina (a baixo). A esquerda obtida no banco de dados Nist Webbook e a direita experimentalmente.



Fonte: Autora, 2022

O ácido acético trata-se de um ácido carboxílico de cadeia curta e pelo seu espectro de massa é possível propor um padrão de fragmentação de acordo com os picos de massa carga observados. A figura 18 retrata a proposta de ionização e fragmentação ocorrida dentro do equipamento. A priori a molécula se ioniza perdendo um elétron do oxigênio da carbonila por uma fonte de ionização que promove o impacto de elétrons, possibilitando a fragmentação da molécula. Posteriormente, como trata-se de um ácido carboxílico, tenderá a perder a hidroxila (OH) por segmentação  $\alpha$  assim como mostra Pavia et al (2015) e por fim, gerando o íon acílo e promovendo uma ressonância explicando o que explica a intensidade do pico  $m/z = 43$ .

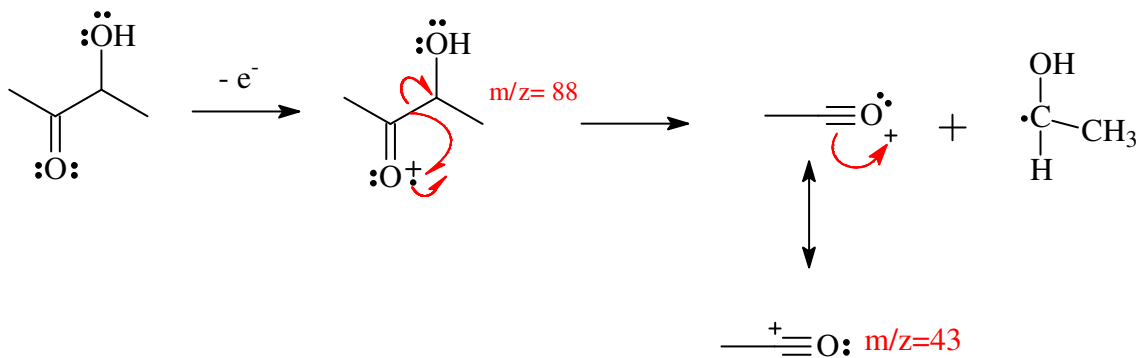
**Figura 18** - Proposta de fragmentação do ácido acético.



Fonte: Autora, 2022

Do mesmo modo, a molécula de acetoína passou por um processo de ionização, na qual tendeu a perder um dos elétrons do oxigênio da carbonila, sendo a mais propensa a essa perda, como mostra a figura 19. Acetoína trata-se de uma cetona que possui uma hidroxila no carbono 3 e ao analisar o espectro de massa (figura 17), percebe-se que o pico do íon molecular é bem baixo resultado da instabilidade da molécula ionizada, por esse motivo, ao se fragmentar por clivagem  $\alpha$ , perdendo o grupo radical mostrado na figura 19, gera um íon  $m/z = 43$  que apresenta uma estabilidade maior em decorrência da ressonância. Pavia et al (2015), considera que nas fragmentações de cetonas, o maior grupo alquila será perdido, de acordo com a Regra de Stevenson, formando assim o íon acílo, assim como a proposta de fragmentação a baixo.

**Figura 19** - Proposta de fragmentação da acetoína.



Fonte: Autora, 2022

A presença de acetoína no Kefir também foi relatada por Guzel-Seydim, Seydim e Greene (2000), entretanto, os autores não identificaram em suas amostras a presença do ácido acético. Isso pode ser justificado pela composição microbiológica dos grãos, pois a mesma pode variar de acordo com a região, possibilitando assim, diferentes parâmetros físico-químicos (LIMA; DO NASCIMENTO; DE FARIAS, 2019), da mesma forma, a matriz a ser fermentada também pode variar o perfil sensorial e químico. Portanto, a presença de ácido acético na

amostra pode ser esclarecida pela composição dos grãos em ação conjunta com o tipo de leite utilizado.

No total 13 compostos foram identificados, variando entre cetonas, aldeído, ácidos e ésteres, como mostra a tabela 5. Wang et al (2021), em seu trabalho estudando a composição química do Kefir, também detectou a presença dessas classes de compostos nas suas amostras, entretanto, em outras condições, como a 2-heptanona.

**Tabela 5** - Compostos químicos identificados no Kefir fermentado em 48h com tempo de extração de 55min.

Nº	Composto	IR <sub>exp</sub> <sup>1</sup>	IR <sub>lit</sub> <sup>2</sup>	% área do pico <sup>3</sup>	Ref. <sup>4</sup>	SI (%) <sup>5</sup>
1.	ácido acético	703	646	35,11	Lozano et al (2007)	96,2
2.	Acetoína	747	743	30,55	Mahattanatawee et al (2007)	86,1
3.	ácido butanóico	796	790	2,08	Pino et al (2005)	78,8
4.	etil-benzeno	857	868	0,78	Pino et al (2005)	90,5
5.	acetato de 3-metil-1-butanol	874	869	0,59	Adams (2007)	88,2
6.	2-heptanona	885	889	2,57	Adams (2007)	88,9
7.	Octanal	973	981	0,17	Weissbecker et al (2004)	76,8
8.	Acetofenona	1065	1066	0,18	Pavlovic et al (2006)	83,2
9.	2-nonanona	1091	1087	2,32	Adams (2007)	89,2
10.	éter hexil octil	1126	-	0,14	Pino et al (2005)	76,6
11.	Dodecano	1200	1200	0,08	Adams (2007)	82,3
12.	2-undecanona	1295	1293	0,19	Adams (2007)	79,1
13.	Tetradecano	1400	1400	0,11	Adams (2007)	84,1

Nº: ordenação dos compostos por eluição; 1 = Índice de retenção experimental; 2 = Índice de retenção da literatura; 3 = Área percentual estimada pela normalização das áreas; 4 = Referências bibliográficas; 5 = Índice de similaridade com base no *R. Match* do programa.

Ao analisar apenas a amostra branca, leite UHT, notou-se a presença do acetato de etila e após a fermentação, o mesmo deu origem ao ácido acético via hidrólise enzimática. Os demais compostos da tabela 5 não foram encontrados no branco, indicando que os mesmos são produtos da fermentação e compõem o perfil sensorial do Kefir, conferindo características únicas.

Arslan (2015) traz em seu trabalho compostos químicos que estão presentes no Kefir, entre eles a acetoína e o ácido acético, que são tratados como compostos principais que conferem sabor e aroma à bebida. Segundo Martins et al (2012), o uso do Kefir na dieta hospitalar pode contribuir para inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos, graças aos compostos químicos presentes no mesmo, entre eles, a acetoína.

O ácido butanóico, a 2-heptanona e a acetoína já foram relatados em outros trabalhos (RIBEIRO et al., 2014, SERVILI et al., 2011) envolvendo o uso de microrganismos para a

produção de bebidas lácteas e fermentadas. A segunda, pode ter sua origem associada a uma oxidação de ácidos graxos saturados livres e/ou descarboxilação de ácidos cetó-beta, como mostra Servili et al (2011).

## 5.2 Produção das cervejas

A produção das cervejas foi um processo trabalhoso consistindo em várias etapas que exigiam cautela, pois, como mostrado anteriormente, cada etapa possui uma importância para a qualidade da bebida. Os maltes utilizados deram origem a um mosto bem açucarado e escuro, caracterizando o estilo da bebida, *Barley Wine*, em português, vinho de cevada. Este possui propriedades organolépticas por se tratar de uma cerveja rica, fortemente maltada, com bons aromas frutados intensos, de cor escura e teor alcoólico elevado, mas suave e arredondado, quando envelhecida pode trazer características de vinho do porto (BONACCORSI, 2018).

O teste de iodo realizado na mostura auxiliou no controle desse processo, pois, segundo Farini e Borges (2016), as moléculas complexas como amilose e amilopectina, sofrem reações de complexação e formam compostos coloridos, azul e/ou vermelho-violáceo, e no fim da mosturação, a cor formada pela complexação desaparece. Esses fatores indicam que todo o amido presente foi convertido em açúcares mais simples, indicando o fim da mosturação. Este teste é muito utilizado por cervejeiros para avaliar e controlar essa etapa de produção.

Na fermentação, foram necessários alguns cuidados para que não houvesse contaminação, por exemplo, uma solução de iodo à 12,5 ppm era produzida para higienização da geladeira. Vale ressaltar que, como os grãos de Kefir se desenvolvem melhor no calor, dois garrafrões de cerveja foram colocados para fermentar na temperatura ambiente do laboratório, para que fosse possível analisar as diferenças de fermentação por meio da comparação com a cerveja fermentada em temperatura controlada.

A fermentação durou em torno de 2 semanas, sendo necessário um processo de otimização nessa etapa para que o tempo seja reduzido, evitando assim possíveis contaminações e produção de *off-flavors*. As bebidas apresentaram uma tonalidade âmbar, sabor marcante com toques frutados trazendo características de vinho. A cerveja fermentada com Kefir, entretanto, necessitará passar por algumas melhorias para que a mesma se torne mais agradável ao paladar, ou seja, aumentar a sua drinkabilidade. Sob essa perspectiva, as cervejas de Kefir fermentadas em temperatura controlada, tiveram maior aceitação sensorial do que as cervejas fermentadas em temperatura ambiente.

Em toda a etapa de fermentação, alíquotas de cerveja de cada garrafrão eram retiradas para análise do grau brix, °Brix, por meio de um refratômetro e verificar se a fermentação havia concluído. Se por três dias consecutivos o valor fosse o mesmo, então o processo havia se

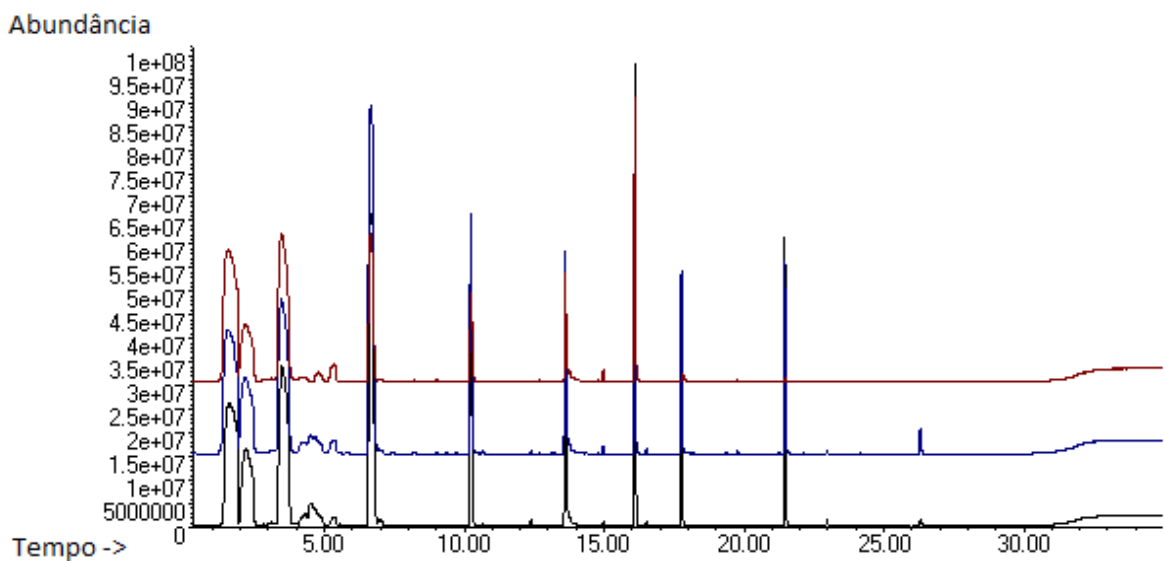
encerrado. O °Brix indica o teor de açúcar aproximado da bebida, considerando que 2 °Brix produz 1 °GL (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001).

Inicialmente, anterior à fermentação, o valor do °Brix do mosto era de 18,9 com uma densidade de 1.078, indicando que o produto final teria por volta de 8,2% de álcool. Ao final do processo de fermentação, as cervejas convencionais e as com Kefir, apresentaram um °Brix de respectivamente 9 e 11. Esses valores foram convertidos para valor de álcool por volume, do inglês *Alcohol by Volume* (ABV), por meio do aplicativo BrewKing, obtendo respectivamente 8,9 % e 7,3 % de teor alcoólico e pH em 5,5.

### 5.3 Análise por GC-MS e perfil volátil

O uso da SPME para obtenção do perfil volátil da bebida por meio de análises cromatográficas, se mostrou bastante favorável, pois, obteve-se cromatogramas bem definidos com bandas cromatográficas com boa definição e resolução (figura 20), facilitando na identificação dos compostos. Um dos fatores que contribuíram para os bons resultados é pela cerveja apresentar um perfil aromático bem característico. De acordo com Martins et al (2015), a SPME, tem sido muito empregada nas cervejarias para as análises dos componentes voláteis das bebidas, principalmente por permitir uma preparação rápida e eficiente das amostras, além de permitir uma amostragem, extração e pré-concentração simultânea de acordo com a sorção dos analitos com o *headspace*.

**Figura 20** - Cromatogramas de íons totais dos voláteis das cervejas artesanais com tempo de extração de 30min. Em vermelho cerveja convencional, azul cerveja com Kefir em temperatura controlada e preto com Kefir em temperatura ambiente.



Fonte: Autora, 2022

Por meio da figura 20 é possível fazer um comparativo visual do perfil químico de cada cerveja produzida e nota-se que, apesar da substituição do fermento tradicional por grãos de

Kefir, a bebida continuou sendo cerveja, ou seja, o processo de fermentação não foi alterado, portanto, houve êxito nessa etapa. Foram identificados 18 compostos voláteis nas bebidas como mostra a tabela 6, entretanto, apenas 14 compostos foram identificados na cerveja convencional. Vale ressaltar que, nenhum composto que produz características *off-flavour* foi identificado.

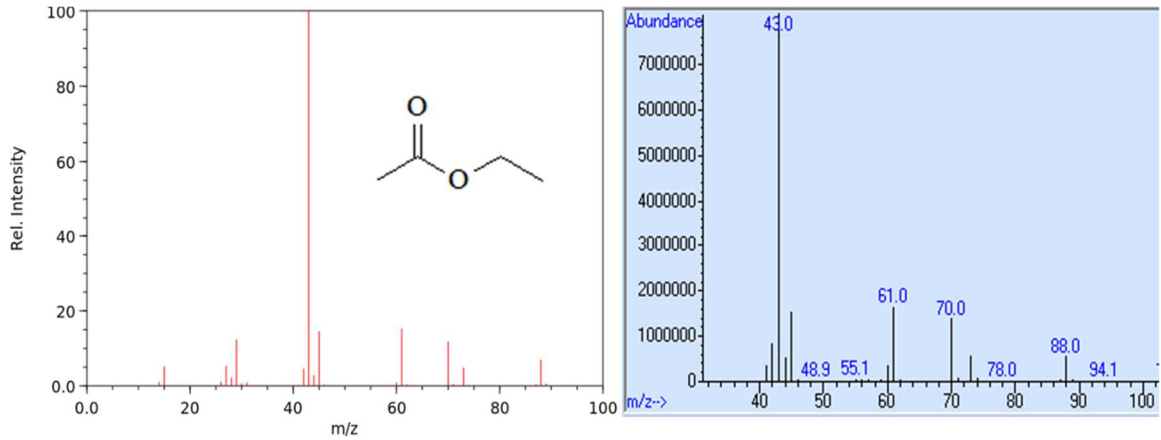
As análises mostraram a presença majoritária de álcoois e ésteres assim como Coelho Neto et al (2020), justificando o perfil sensorial da bebida. Entre os compostos comuns nas três amostras destacam-se etanol, acetato de etila (figura 21), álcool isopentílico (figura 22) e acetato de isopentila (figura 23) por apresentarem maiores concentrações relativas.

**Tabela 6** - Constituintes químicos voláteis presentes nas cervejas extraídos por HS-SPME e analisadas por GC/MS.

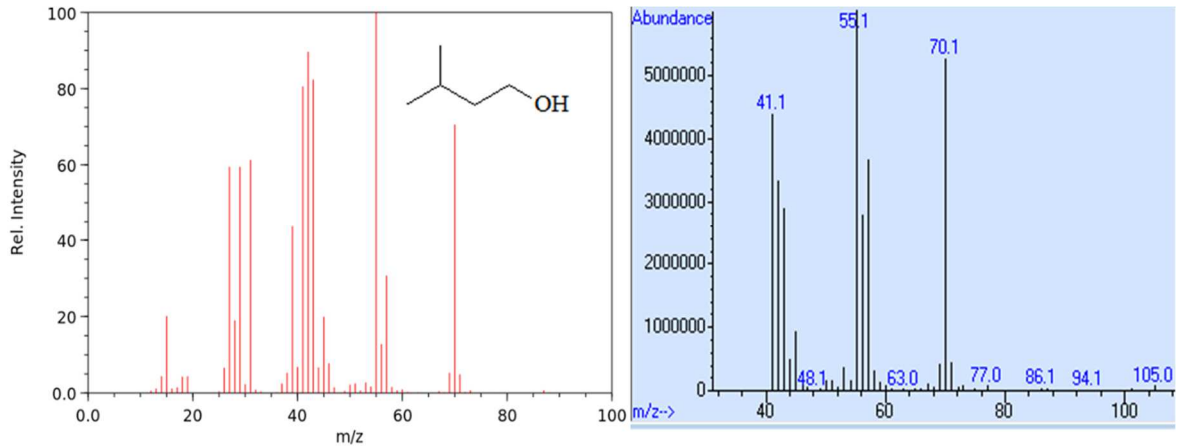
Nº	TR	Componentes	% média das áreas dos picos <sup>d</sup>					Referência	SI (%)
			IR <sup>b</sup>	IR <sup>c</sup>	KTA	KTC	LV		
1	1.629	Etanol	-	-	17,91±4,0	17,74±2,6	28,09±3,4	Adams (2007)	89,6
2	2.192	Acetato de etila	662	605	11,79±0,9	8,93±3,4	12,09±0,2	Pino et al (2005)	90,2
3	3.500	Álcool isopentílico	716	731	17,39±4,0	17,78±0,6	25,85±0,4	Adams (2007)	92,3
4	4.293	Acetato de isobutila	748	761	1,03±0,1	1,21±0,0	0,11±0,2	Adams (2007)	79,2
5	4.509	2,3-butanodiol	757	785	1,57±0,2	1,38±0,2	-	Adams (2007)	90,4
6	4.690	Butanoato de etila	765	798	1,31±0,2	1,58±0,1	1,13±0,1	Mahattanatawee et al (2005)	88,3
7	6.685	Acetato de isopentila	860	869	21,25±0,3	24,74±2,2	14,37±1,4	Adams (2007)	89,6
8	6.992	Estireno	876	890	0,38±0,0	0,39±0,2	0,18±0,2	Pino et al (2005)	91,0
9	10.246	Hexanoato de etila	998	997	7,12±0,3	8,03±1,4	4,38±0,1	Adams (2007)	92,8
10	10.670	Acetato de hexila	1013	1007	-	0,09±0,0	-	Adams (2007)	92,3
11	12.388	Octanol	1070	1063	0,15±0,0	0,03±0,0	-	Adams (2007)	81,1
12	13.614	Álcool feniletílico	1112	1107	4,67±0,8	3,98±1,2	5,38±1,9	Adams (2007)	94,0
13	16.112	Octanoato de etila	1198	1196	8,36±0,2	7,22±1,9	7,75±1,1	Adams (2007)	95,7
14	16.516	Acetato de octanol	1213	1211	0,10±0,0	0,12±0,0	-	Adams (2007)	82,8
15	17.767	2-acetato de fenetila	1258	1254	2,23±0,3	2,51±0,7	0,42±0,1	Adams (2007)	96,1
16	21.470	Decanoato de etila	1397	1395	4,48±0,3	3,83±0,7	0,13±0,0	Adams (2007)	88,7
17	22.977	α-humuleno	1457	1452	0,09±0,0	0,11±0,0	0,03±0,0	Adams (2007)	91,0
18	26.310	Dodecanoato de etila	1596	1594	0,13±0,1	0,33±0,2	0,09±0,1	Adams (2007)	90,8

Nº: ordenação dos compostos por eluição; IR<sup>b</sup> = Índice de retenção experimental; IR<sup>c</sup> = Índice de retenção da literatura; d = Área percentual dos compostos com base na normalização das áreas por GC-MS; KTA = cerveja fermentada com Kefir em temperatura ambiente; KTC = cerveja fermentada com Kefir em temperatura controlada; LV = cerveja fermentada com levedura cervejeira; SI = Índice de similaridade com base no *R. Match* do programa.

**Figura 21** - Espectros de massa do acetato de etila. A esquerda espectro obtido no banco de dados Nist Webbook e a direita experimentalmente.

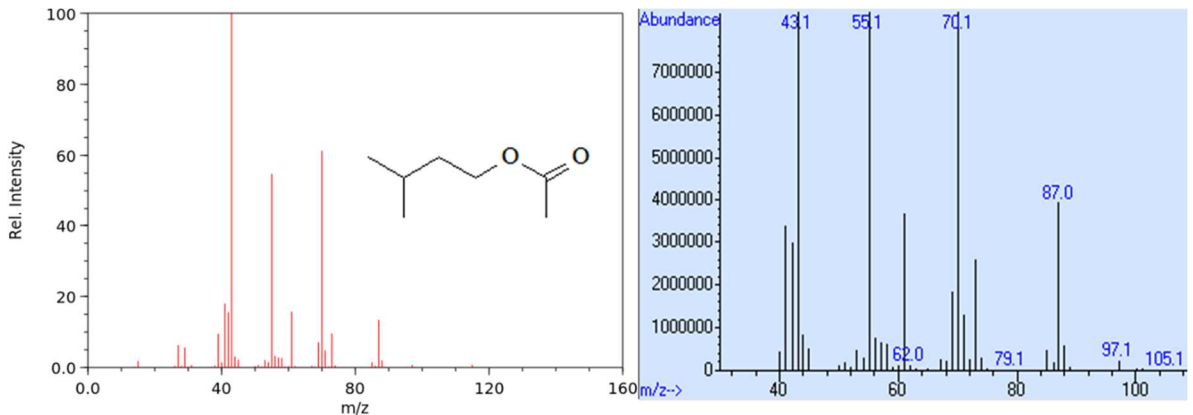


**Figura 22** - Espectros de massa do álcool isopentílico. A esquerda espectro obtido no banco de dados Nist Webbook e a direita experimentalmente.



Fonte: Autora, 2022

**Figura 23** - Espectros de massa do acetato de isopentila. A esquerda espectro obtido no banco de dados Nist Webbook e a direita experimentalmente.

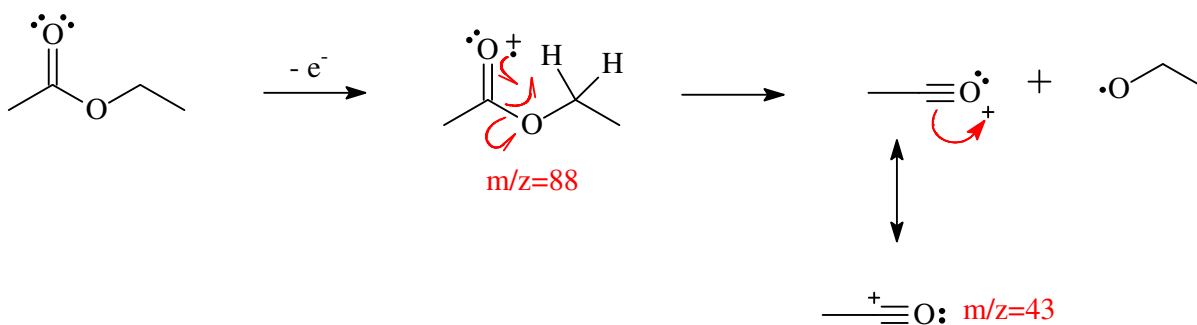


Fonte: Autora, 2022

Pelo espectro de massa do acetato de etila nota-se a baixa intensidade do pico  $m/z = 88$ , pico do íon molecular, que assim como a acetoina, após a ionização da molécula a mesma apresentou uma certa instabilidade, gerando assim uma série de fragmentações e uma delas

forma o pico  $m/z = 43$  de maior intensidade e, portanto, pico do íon base. Para que ocorra a formação do mesmo, segundo Pavia et al (2015), ésteres com mais de quatro carbonos tendem a formar picos de íon molecular que se fragmentam muito rapidamente por meio de clivagem  $\alpha$  perdendo o grupo alcoxi para a formação do íon acílo, no caso do acetato de etila o íon  $m/z = 43$ , como mostra a figura 24.

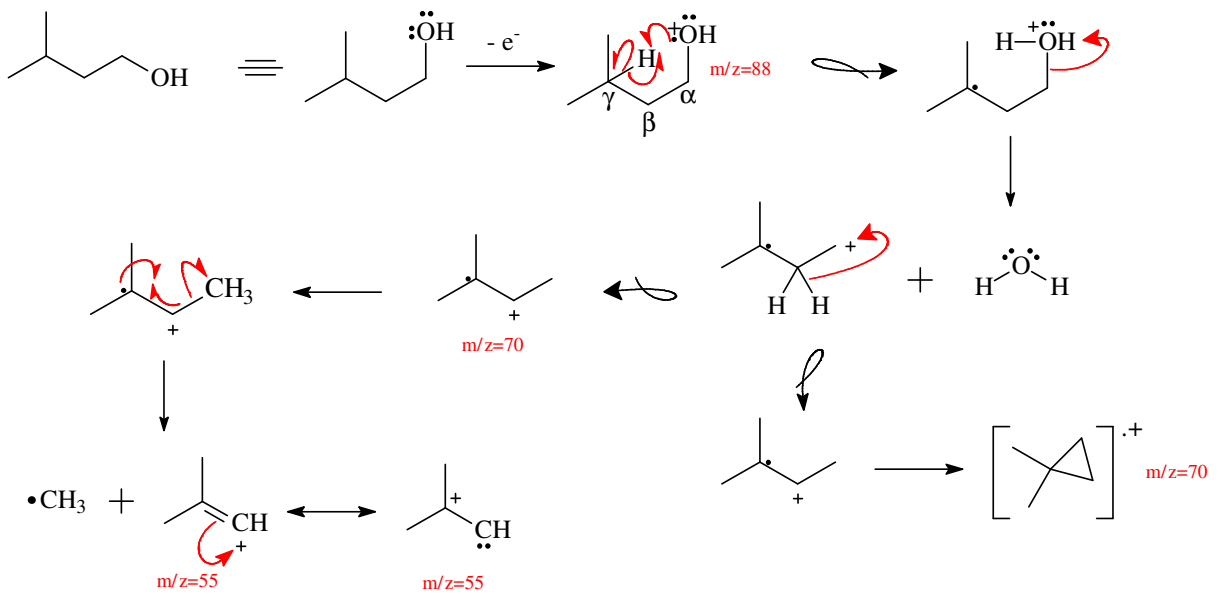
**Figura 24** - Proposta de fragmentação do acetato de etila.



Fonte: Autora, 2022

De acordo com Pavia et al (2015) e analisando a figura 22, nota-se que o pico do íon molecular de álcoois é bem baixo e na maioria das vezes nem é observado como é o caso do álcool isopentílico que apresenta a ausência do pico  $m/z = 88$ . Um dos fatores que implicam esse fenômeno é pela desidratação da molécula para formar o pico  $m/z = 70$  por meio de um deslocamento de hidrogênio radicalar no carbono  $\gamma$  e posteriormente uma clivagem heterolítica da ligação do carbono com o oxigênio, como mostra a figura 25. Pela intensidade do pico  $m/z = 70$  pressupõe que há uma formação de uma estrutura estável, dessa forma, propõe-se o rearranjo da molécula para formar um composto cíclico. Outro pico observado é o  $m/z = 55$  caracterizado como pico do íon base do álcool isopentílico, para a formação do mesmo sugere-se partir do  $m/z = 70$  para a perda do grupo alquila por clivagem homolítica.

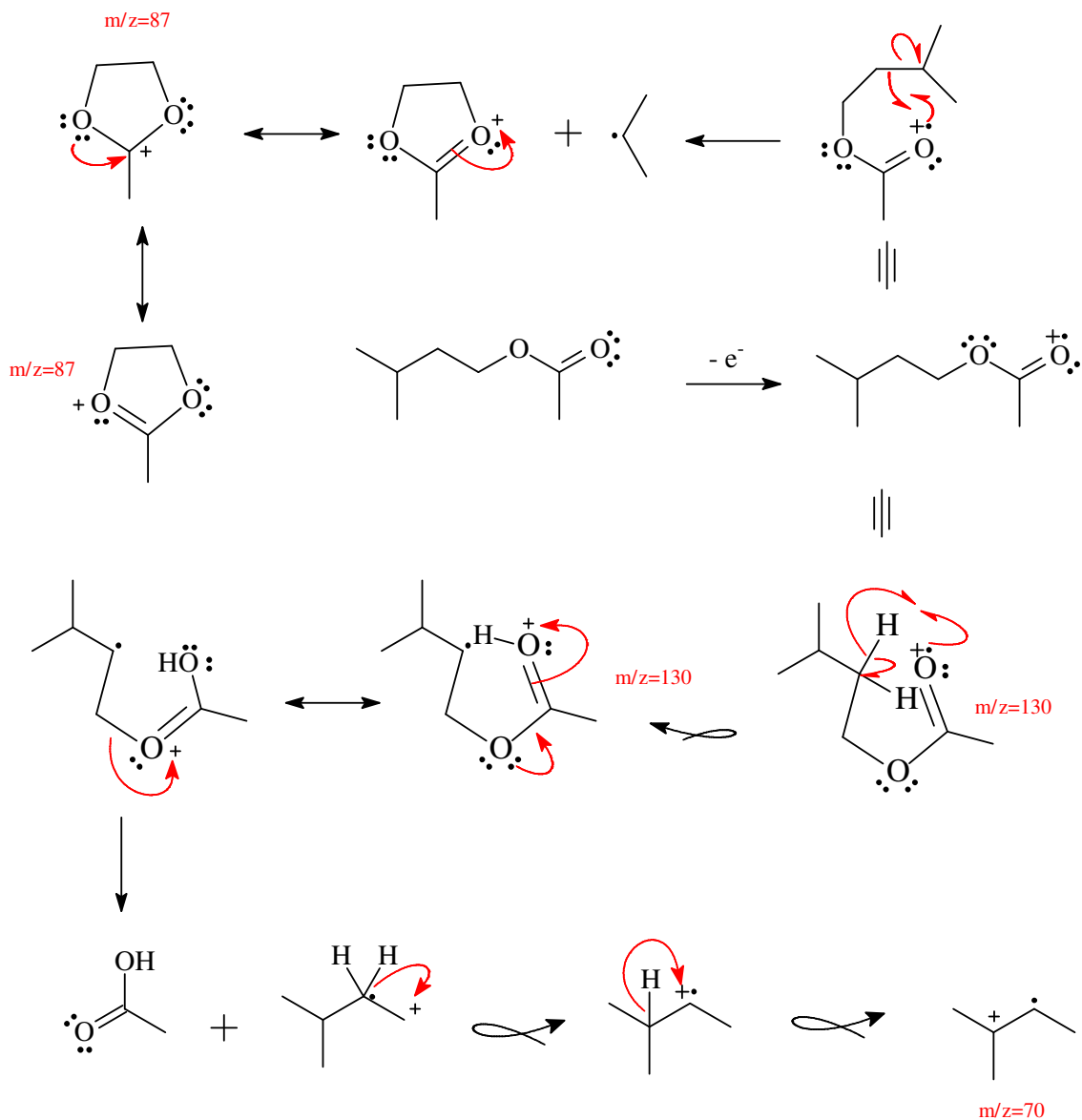
Figura 25 - Proposta de fragmentação do álcool isopentílico.



Fonte: Autora, 2022

Em relação a fragmentação do acetato de isopentila de acordo com a figura 23, ocorrerá a ionização da substância formando assim o pico do íon molecular  $m/z = 130$  que, assim como no álcool isopentílico, é ausente por conta da rápida fragmentação do mesmo como mostra Pavia et al (2015). A primeira rota de fragmentação é para a obtenção do pico  $m/z = 87$  pela liberação de um radical alquila a partir da clivagem homolítica e formação de um composto cíclico que apresentará estabilidade em decorrência da ressonância formada, como mostra a figura 26. Outra rota de fragmentação é para a obtenção do pico  $m/z = 70$  pela liberação da molécula de ácido etanóico.

Figura 26 - Proposta de fragmentação do acetato de isopentila.



Fonte: Autora, 2022

Vale destacar que o acetato de isopentila apresentou maior concentração nas cervejas fermentadas com Kefir e o álcool isopentílico na convencional. Da mesma forma, o etanol se mostrou mais presente na cerveja convencional, confirmando as análises do °Brix na qual mostrou que a mesma teria um valor de ABV mais elevado. Um dos benefícios identificados inicialmente na cerveja fermentada por Kefir é a redução do teor alcoólico, na qual também foi relatada Rodrigues et al (2016). Os autores consideram que essa diminuição contribui para acentuar as atividades anti-inflamatórias e antiulcerogênicas.

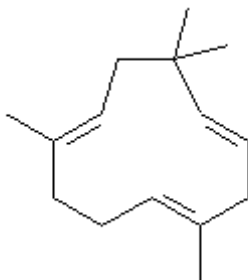
O 2,3-butanodiol, acetato de hexila, octanol e acetato de octanol, não foram identificados na cerveja convencional, mostrando que o perfil químico das cervejas fermentadas

pelos grãos de Kefir possuem uma composição química mais acentuada, o que justifica ainda mais as atividades apresentadas por Rodrigues et al (2016). Vale destacar que, foi identificado um composto nas cervejas fermentadas em temperatura controlada que não se fez presente na fermentada em temperatura ambiente. A presença do acetato de hexila pode ser justificado pelo controle da temperatura, que auxiliou no bom desenvolvimento dos grãos para a conversão dos açúcares.

Em todas as amostras de cerveja produzida e analisada, foram identificadas a presença do humuleno, composto químico obtido por meio do óleo essencial das flores de lúpulo. Como este trata-se do “tempero” da bebida como mostra Silva (2017), ao ser adicionado no mosto durante a fervura, em consequência das elevadas temperaturas, liberam compostos que darão sabores específicos à bebida, principalmente no óleo essencial (COELHO NETO et al., 2020, JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009). O estilo de cerveja adotado para a produção também justifica a presença desse composto, mesmo que em baixa concentração (0,09; 0,11; 0,03%).

O  $\alpha$ -humuleno (figura 27), trata-se de um sesquiterpeno monocíclico que compõe juntamente com outros compostos, cerca de 80 a 90% dos óleos essenciais do lúpulo, entretanto, por esses compostos apresentarem baixa solubilidade em água, grande parte deles é volatilizada no processo de fervura, como apresenta Durello, Silva e Bogusz (2019) no seu trabalho. Isso pode explicar a presença desse composto nas bebidas com concentrações determinadas.

**Figura 27** - Estrutura química do  $\alpha$ -humuleno, principal composto encontrado no óleo essencial do lúpulo.



Fonte: Autora, 2022

#### 5.4 Análise por HPLC-DAD e perfil metabólico

Para estudar e analisar o perfil das cervejas, principalmente para poder comparar a composição metabólica das fermentadas por kefir e da tradicional, foi empregado o uso do cromatógrafo a líquido, assim como Yamauchi et al (1995) utilizaram para analisar cervejas e Cheiran et al (2019) para identificar compostos benéficos da bebida à saúde. O mesmo possui uma alta sensibilidade, precisão para determinação e identificação de compostos desde estruturas simples às mais complexas por meio de separações que resultam de partição,

adsorção, troca iônica e exclusão por tamanho ou interação estereoquímicas (CASTRO, 2016, BOGER et al., 2018).

Por SPE foi possível observar muita interação dos compostos com a fase apolar do cartucho, sendo necessária uma última fração em metanol para extrair os compostos retidos. Por fim, 15 alíquotas de diferentes frações foram obtidas. A primeira etapa das análises cromatográficas o equipamento operou no modo reverso devido a fase móvel ser composta de metanol e água deionizada.

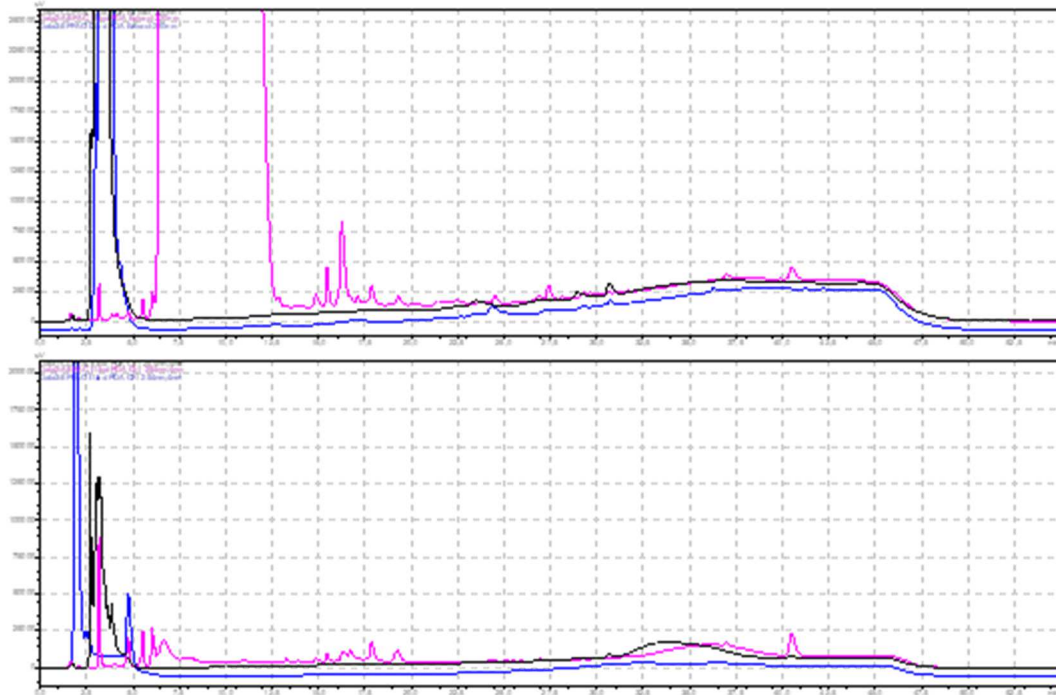
Os cromatogramas obtidos foram sobrepostos (figuras 28 a 32) para que fosse possível comparar o perfil de cada amostra de cerveja em diferentes fermentações, consequentemente as diferentes substâncias que conferem as propriedades organolépticas das bebidas e possivelmente os compostos que atribuem as capacidades benéficas das cervejas. Avaliando os dados gerados, pode-se notar uma pequena diferença no perfil químico das amostras, além disso, foi possível observar que em todas as análises houve a presença de compostos hidrofílicos presentes logo no início da corrida, mas também a presença de compostos apolares à medida que a porcentagem do solvente B aumentava.

**Figura 28** - Cromatogramas sobrepostos das cervejas em fração aquosa. Em preto cerveja fermentada por kefir em temperatura controlada, rosa em temperatura ambiente e azul cerveja convencional. A primeira em 220 nm e a segunda em 274 nm.



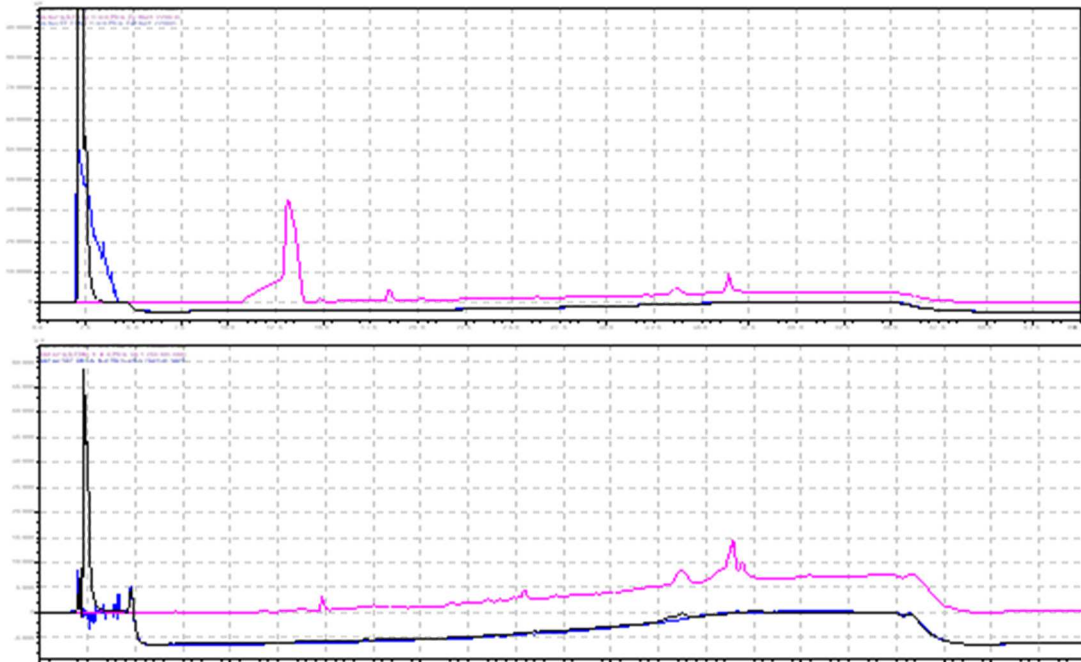
Fonte: Autora, 2022

**Figura 29** - Cromatogramas sobrepostos das cervejas, fração acetato de etila. Em preto cerveja fermentada por kefir em temperatura controlada, rosa em temperatura ambiente e azul cerveja convencional. A primeira 220 nm e a segunda 274 nm.



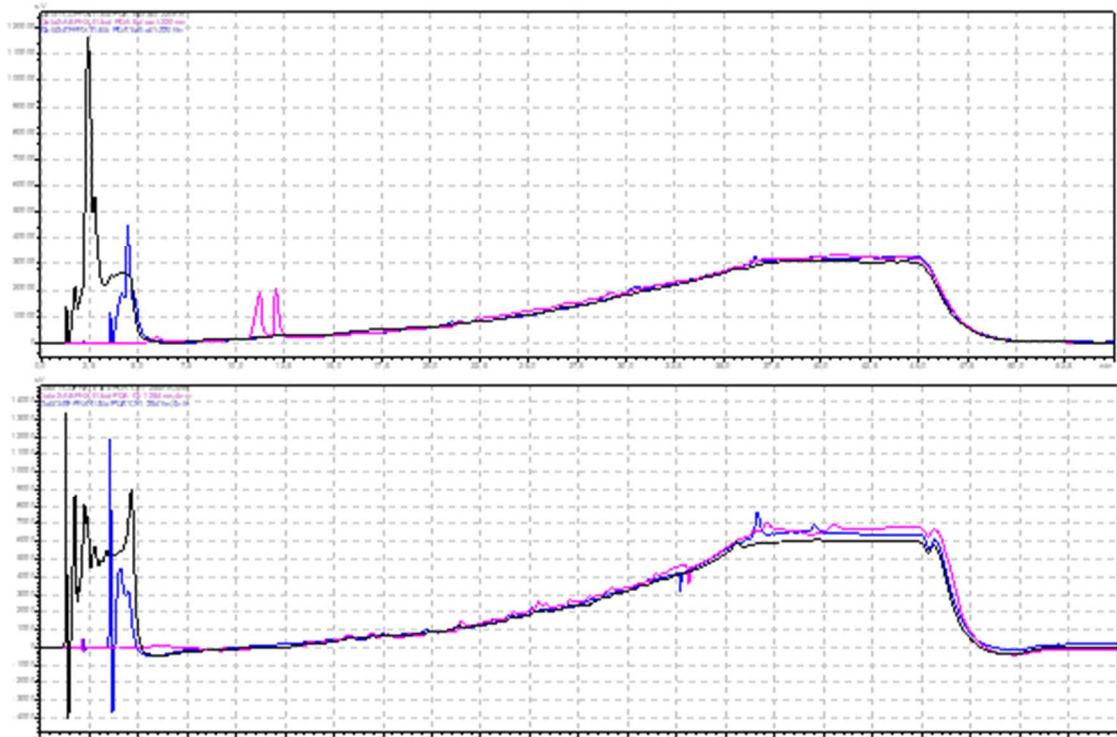
Fonte: Autora, 2022

**Figura 30** - Cromatogramas sobrepostos das cervejas, fração diclorometano. Em preto cerveja fermentada por kefir em temperatura controlada, azul em temperatura ambiente e rosa cerveja convencional. A primeira 220 nm e a segunda 274 nm.



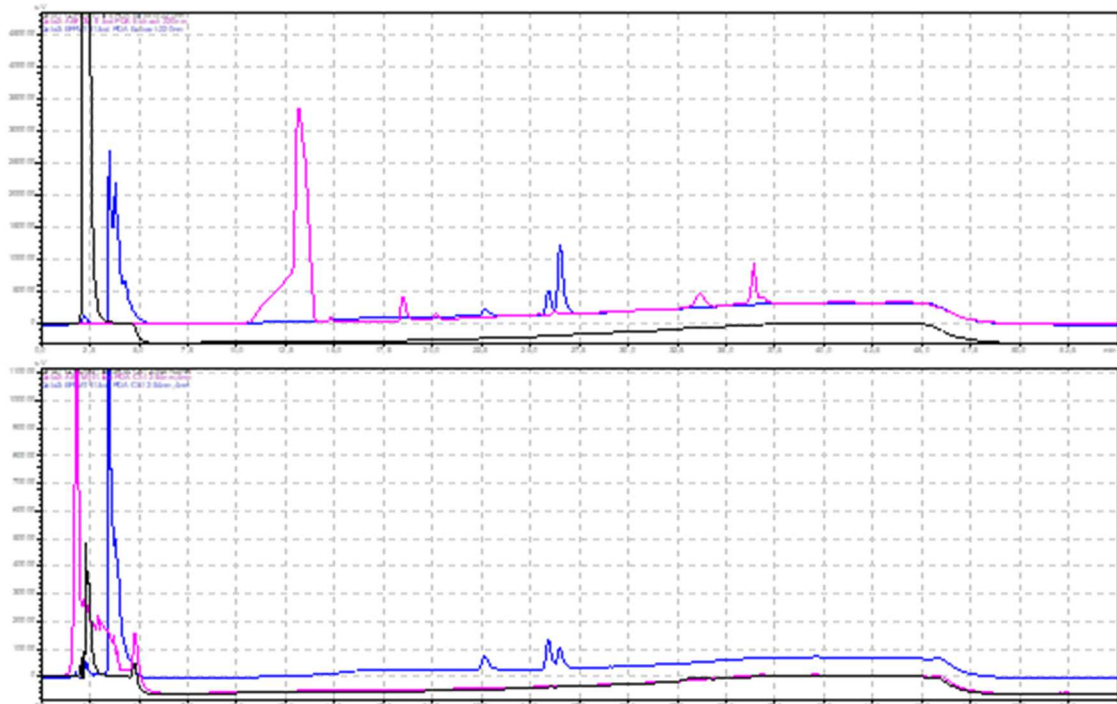
Fonte: Autora, 2022

**Figura 31** - Cromatogramas sobrepostos das cervejas, fração hexano. Em preto cerveja fermentada por kefir em temperatura controlada, rosa em temperatura ambiente e azul cerveja convencional. A primeira 220 nm e a segunda 274 nm.



Fonte: Autora, 2022

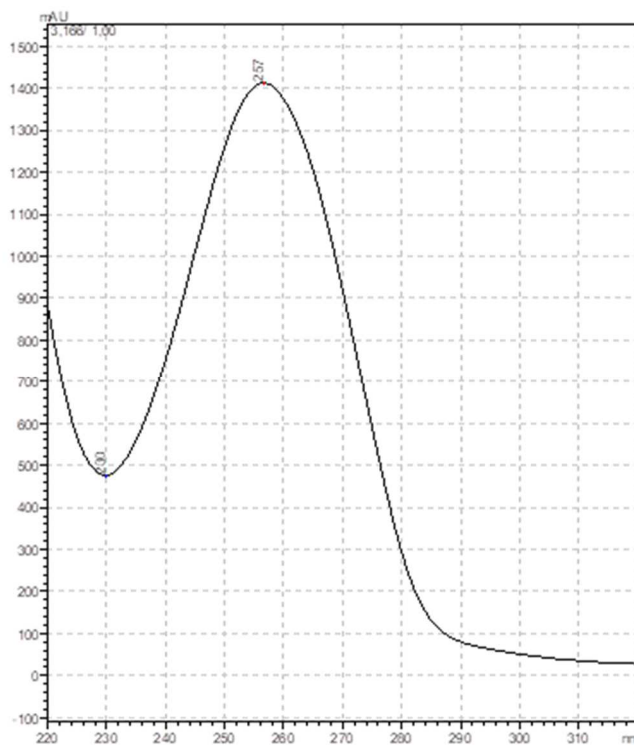
**Figura 32** - Cromatogramas sobrepostos das cervejas, fração metanol. Em preto cerveja fermentada por kefir em temperatura controlada, rosa em temperatura ambiente e azul cerveja convencional. A primeira 220 nm e a segunda 274 nm.



Fonte: Autora, 2022

Outrossim, vale destacar a presença de substâncias que absorveram bem os comprimentos de onda quando analisados os espectros de ultravioleta (UV) indicando a presença de cromóforos, no qual segundo Pavia et al (2015, p. 565), estes são grupos de átomos característicos que detém da capacidade de produzir absorção de energia de transição e comprimentos de onda. Portanto, torna-se difícil prever somente com a absorção a estrutura específica do cromóforo. Nos espectros de UV analisados, foi possível observar que alguns absorviam acima de 220 nm (figura 33), indicando que os compostos possuem possivelmente um grupo orgânico forte como carbonilas, duplas conjugadas, cetonas, aminas e até mesmo compostos fenólicos como flavonóides.

**Figura 33** - Espectro de UV da fração aquosa da cerveja fermentada por kefir em temperatura ambiente com maior absorção em 257 nm em 3,166 min.

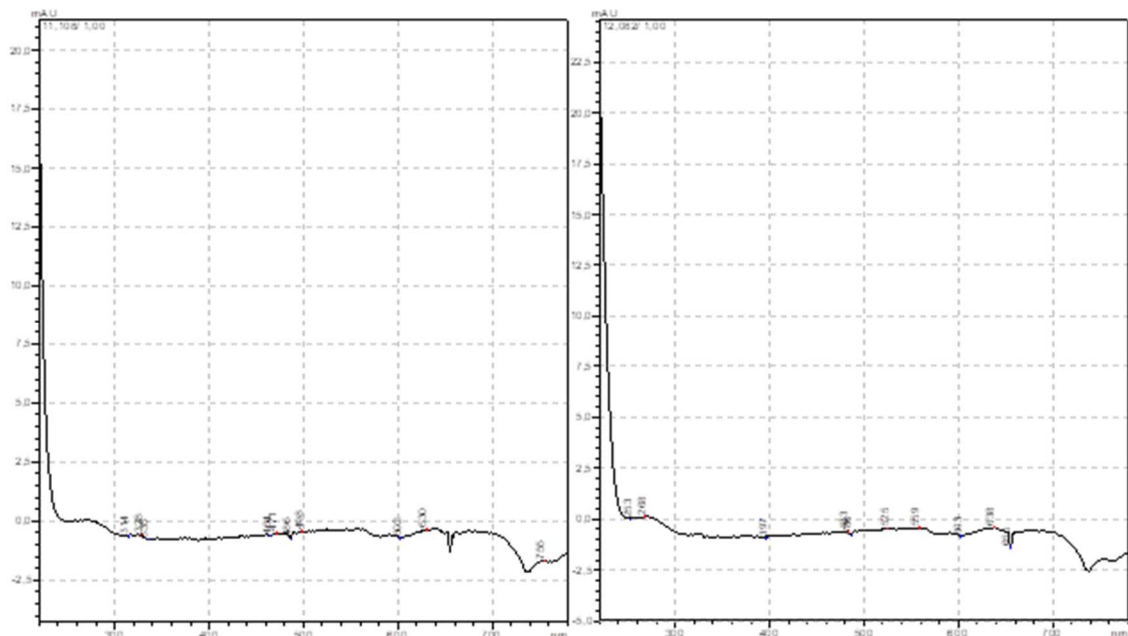


Fonte: Autora, 2022

Dentre os cromatogramas obtidos, pode-se também verificar a presença de duas bandas cromatográficas bem simétricas e idênticas no cromatograma da fração hexânica da cerveja com kefir em temperatura ambiente, como mostra a figura 31. Estas bandas podem estar indicando a presença de possíveis isômeros na bebida, podendo ser cis/trans ou diastereoisômeros. Ao avaliar os espectros de UV, os mesmos apresentaram absorções bem similares em 220 nm (figura 34), não se tratando, portanto, substância que possuem a presença de cromóforos fortes por consequência da baixa absorção, como mostra Pavia et al (2015, p. 565).

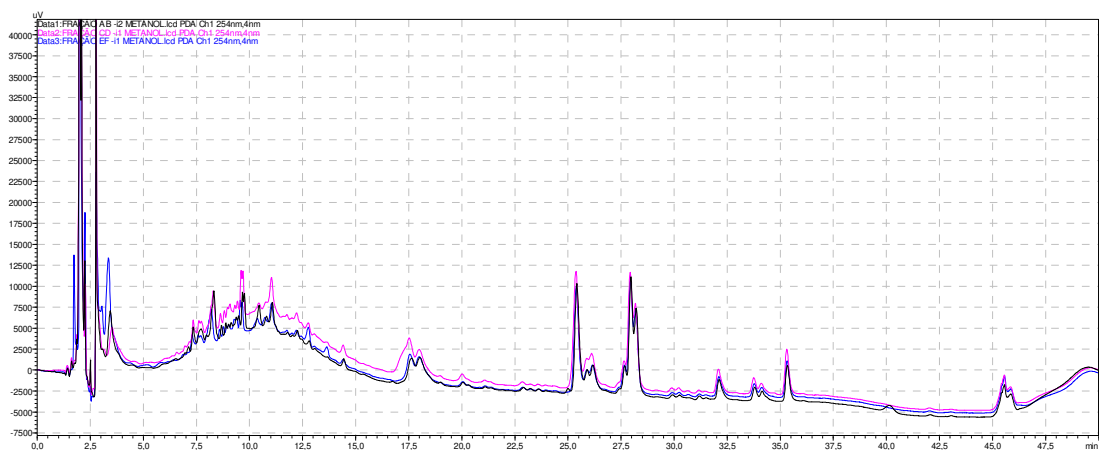
Os dois compostos foram identificados respectivamente nos tempos de retenção 11,10 e 12,08 min, o primeiro com 52,5% de B e o segundo com 55%, mostrando a interação dos mesmos com a fase estacionária, por isso a necessidade de um percentual maior de metanol para a eluição desses compostos. Vale ressaltar novamente que, apesar de apresentarem uma drinkabilidade menor, as cervejas probióticas mostraram nas análises que os seus perfis metabólicos não diferem tanto da cerveja convencional, como mostra a figura 35. Este aspecto demonstra que independente do processo de fermentação utilizado, o produto obtido continuou sendo cerveja.

**Figura 34** - Espectros de UV dos isômeros extraídos das amostras de cerveja com kefir em temperatura ambiente em hexano. A esquerda em 11,10 min e a direita em 12,08 min.



Fonte: Autora, 2022

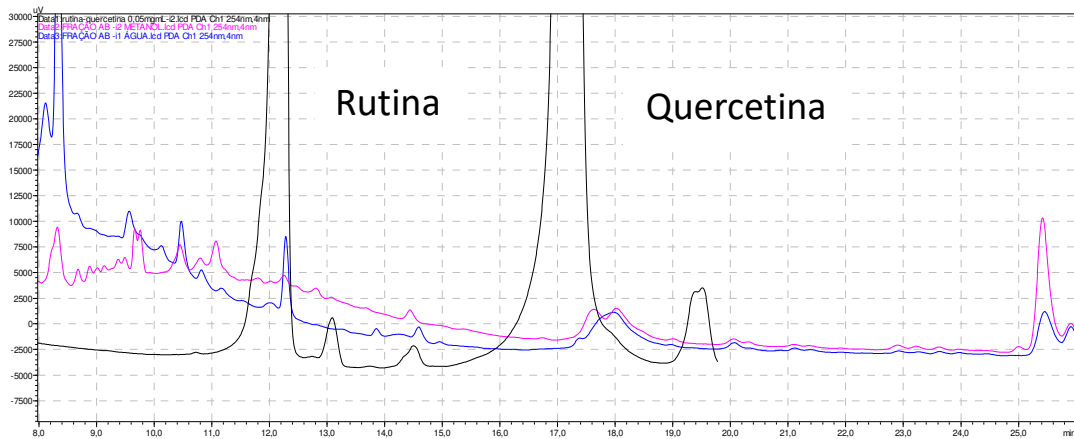
**Figura 35** - Comparação das frações em metanol das cervejas análise em 254 nm: Preto - cerveja probiótica fermentada em temperatura ambiente; Rosa - cerveja probiótica fermentada em temperatura controlada; Azul - cerveja convencional.



Fonte: Autora, 2022

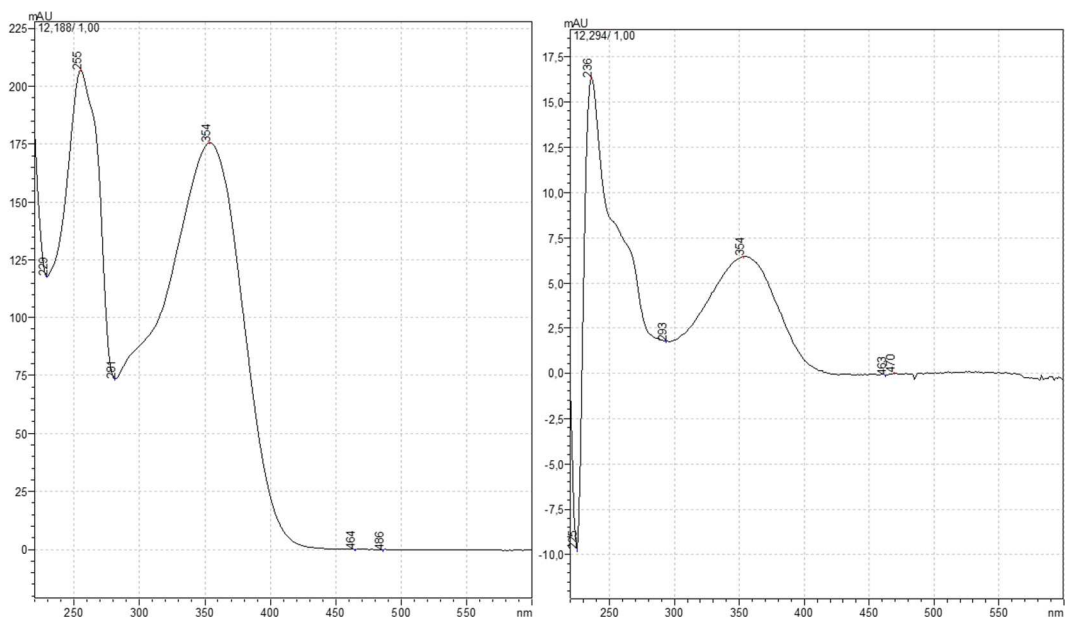
Ao realizar o estudo comparativo entre as amostras padrão de flavonóides e as das bebidas para detectar a presença desses compostos fenólicos, notou-se que a rutina se fazia presente em maior concentração na cerveja fermentada com Kefir do que na convencional (figura 36). Entretanto, para detectar e confirmar a presença de quercetina, era necessário que houvesse uma otimização no tempo de análise das amostras, mas em decorrência do tempo, a mesma não foi realizada. A confirmação dos compostos se deu por meio dos espectros de UV, no qual se mostraram muito similares com os do padrão (figura 37), da mesma forma que, os tempos de retenção desses compostos foram os mesmos.

**Figura 36** - Comparação dos perfis da amostra padrão (linha preta) com a das cervejas de kefir fermentada em temperatura ambiente em fração aquosa (linha azul) e em fração metanólica (linha rosa).



Fonte: Autora, 2022

**Figura 37** - Espectros de UV da rutina: A esquerda da amostra padrão e a direita da cerveja fermentada com Kefir em temperatura ambiente.

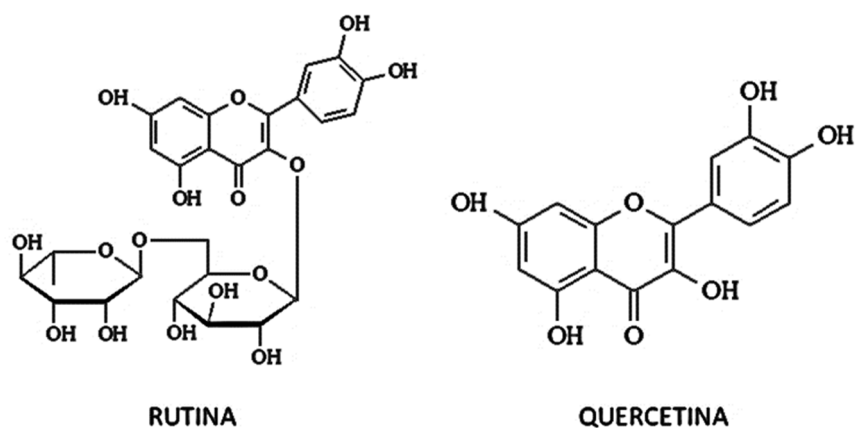


Fonte: Autora, 2022

De acordo com Raven, Evert e Eichhorn (2007), esses compostos possuem origem vegetal e nas cervejas, a presença de compostos fenólicos, em especial flavonóides, provém dos maltes ou do lúpulo adicionado na produção (SILVA et al., 2021). A presença desses compostos na bebida confere à mesma as capacidades bioativas, antioxidantes, anti-inflamatório, antidiabético, atividades estrogênicas, nutritivas, aromáticas e dependendo dos ingredientes utilizados na fabricação da cerveja, diferentes compostos podem ser obtidos (MARQUES et al., 2017, OSORIO-PAZ; BRUNAUER; ALAVEZ, 2020, SILVA et al., 2021).

A rutina (Figura 38), também conhecida como vitamina P, é um bioflavonóide com atividades importantíssimas para o organismo, como por exemplo propriedades anti-hiperglicêmicas (GHORBANI, 2017), diminuindo significativamente os níveis de glicose e aumentando a secreção de insulina, como mostrou Hosseinzadeh e Nassiri-Asl (2014) em testes em ratos hiperglicêmicos.

**Figura 38** - Estruturas químicas dos compostos fenólicos estudados.



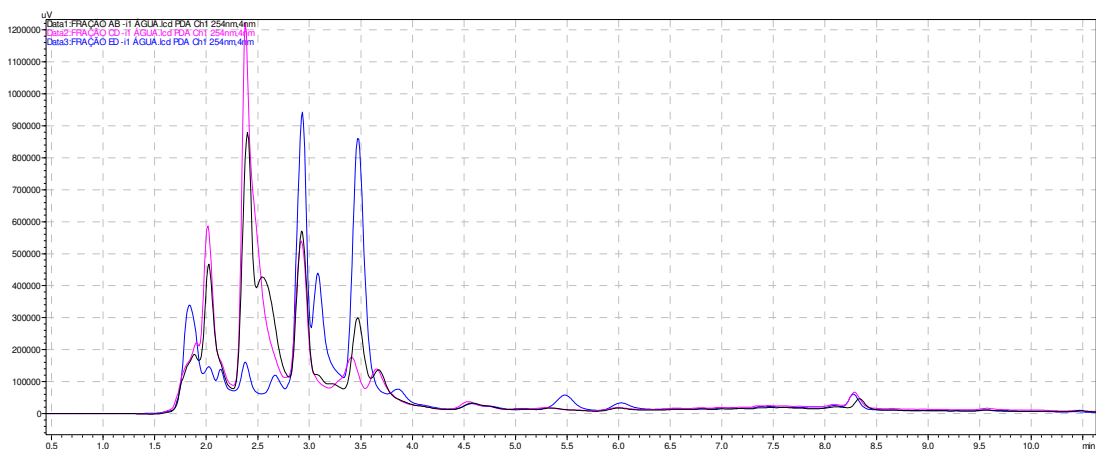
Fonte: Autora, 2022

Rodrigues et al (2016), ao estudar as capacidades benéficas da nova cerveja fermentada com Kefir, identificou que a mesma apresenta capacidades anti-inflamatórias e antiulcerogênicas que provém dessa classe de compostos, e ao adicionar os grãos de Kefir na fermentação, essas atividades foram intensificadas. Dessa forma que, ao estudar o perfil metabólico das bebidas aqui obtidas, nos tempos de retenção próximos aos da quercetina e rutina, 7 min à 19 min, nota-se a presença de inúmeros picos cromatográficos (figura 36). Ao observar os espectros de UV de cada, constata-se que possivelmente, outros compostos fenólicos estão presentes na bebida, mas em decorrência da falta de amostras padrão, não foi possível realizar a identificação dos mesmos.

As duas amostras de cervejas fermentadas com Kefir (fermentada em temperatura ambiente e temperatura controlada) não apresentaram diferenças significativas no perfil

metabólico, indicando que a temperatura não alterou a produção de compostos fenólicos. Outro fator relevante nessas análises é a presença de compostos hidrofílicos no início das corridas, o que mostra que as bebidas possuem em grandes concentrações a presença de carboidratos, açúcares, proteínas e aminoácidos (figura 39), como relatado por Rodrigues et al (2016) e Silva et al (2021). Um aspecto que justifica a presença dessas substâncias é o estilo das bebidas analisadas, pois como se tratavam de *Barley Wine*, apresentam uma característica maltada (FERNANDEZ; MIRIAM, 2019, SILVELLO, 2019).

**Figura 39** - Comparação dos perfis cromatográficos das cervejas em fração aquosa no início das corridas. Preto - cerveja probiótica fermentada em temperatura ambiente; Rosa - cerveja probiótica fermentada em temperatura controlada; Azul - cerveja convencional.



Fonte: Autora, 2022

### 5.3 Análise estatística multivariada

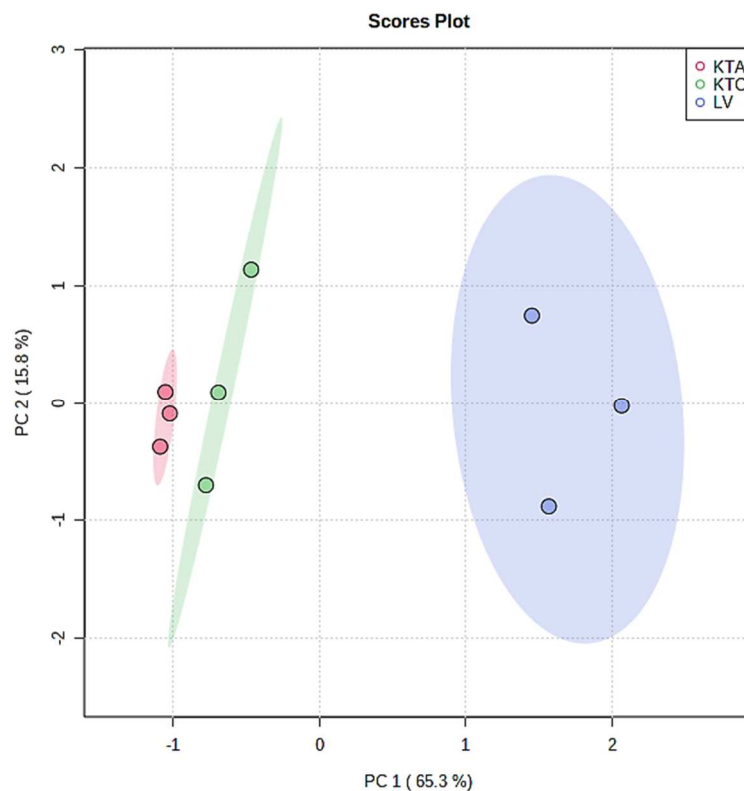
Para analisar melhor os dados, a tabela passou por um pré-processamento para obter resultados tratados. Dessa forma, o procedimento de normalização foi o de mediana da amostra e para a transformação dos dados utilizou-se a escala de intervalo (*range scaling*) que concentra a média e divide pelo intervalo de valores de cada variável. Os dados são armazenados no software online de forma com que as linhas da tabela sejam as 9 amostras e as colunas as variáveis, nesse caso as áreas percentuais dos compostos químicos identificados, no total 18. Vale ressaltar que, as amostras foram classificadas em: KTA, cerveja de kefir fermentada em temperatura ambiente; KTC, cerveja de kefir fermentada em temperatura controlada; LV, cerveja convencional.

Pela PCA, foi possível determinar a menor proporção das variáveis aplicadas justificando dessa forma, o quão próximo os dados utilizados eram das amostras. Segundo Ferreira (2015), essa aproximação forma agrupamentos que representam as novas variáveis que são determinadas por componentes principais (PC - principal components). Ainda de acordo com Ferreira (2015), os PCs são divididos de maneira que as informações se correlacionem: a

PC1 descreve a máxima variância dos dados originais, a PC2 a máxima variância dos dados no subespaço ortogonal a PC1 e assim por diante.

O gráfico bidimensional obtido por meio da PCA (figura 40) está orientado no eixo X pelo PC1 e no eixo Y pelo PC2, as variações estão retratadas entre parênteses. Nesse sentido, a PC1 e PC2 representam 81,1% da variância acumulada dos dados, isto é, o quão as amostras estão próximas entre si. Portanto, por meio da distribuição espacial dessa matriz de dados conforme os PCs, houve a formação de 3 grupos distintos que estão representados pelas elipses e os pontos em cada uma representam as amostras e quanto mais próximas, mais semelhantes estatisticamente. Vale destacar que, as cervejas fermentadas por Kefir (KT) estão mais próximas do que da LV, portanto, apesar das diferenças no processo de fermentação, elas são mais semelhantes em sua composição química no viés estatístico. Nesse sentido, as cervejas com Kefir estão alocadas na parte negativa da PC1, entretanto, a convencional na parte positiva.

**Figura 40** - Representação gráfica da PCA por meio de um gráfico bidimensional, scores.

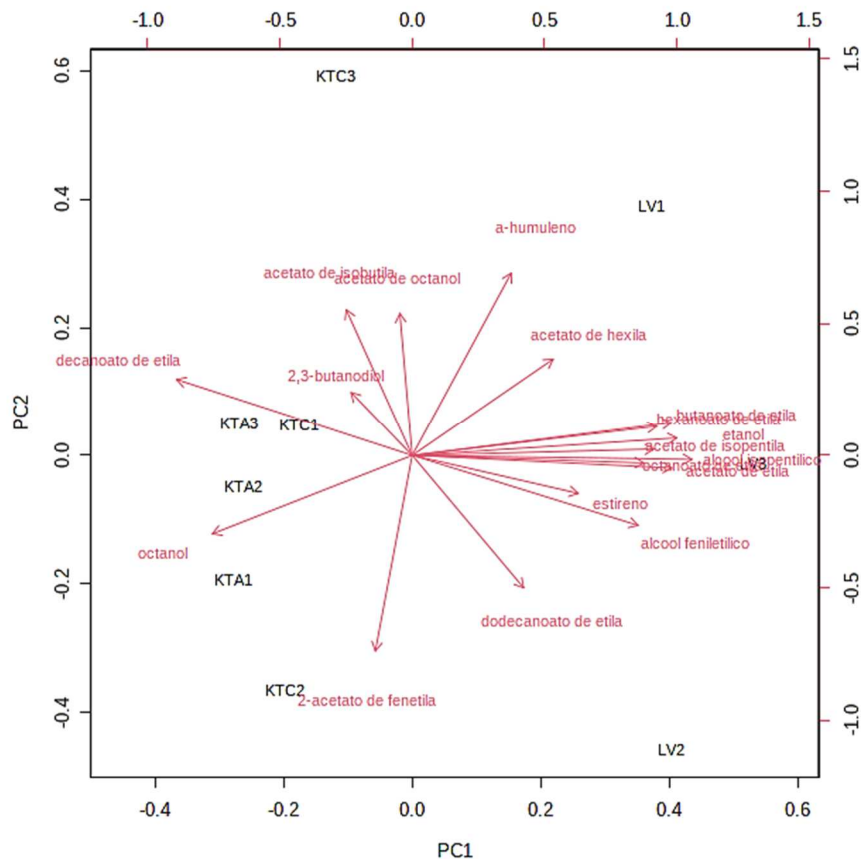


Fonte: Autora, 2022.

A formação desses grupos pode ser explicada pela figura 41, na qual mostra todos os compostos envolvidos e aqueles que mais interferiram para a geração dos grupos. A priori, percebe-se que há uma concentração próximo à 0,4 da PC1 em direção a LV3, explicando a posição da elipse do grupo LV na figura 40. Entretanto, observa-se que alguns compostos vão em direção aos KT e estes estão bem próximos, com exceção do KTC3 localizado em 0,6 da

PC2. Avaliando a figura 41 com as concentrações das áreas percentuais dos compostos na tabela 5 é possível verificar que os compostos que mais contribuíram para a formação do KTA foram o octanol e o decanoato de etila, que justamente possuem maior concentração relativa nessa cerveja, entretanto, para a formação do KTC o 2-acetato de fenetila, acetato de isobutila, acetato de octanol de octanol e o 2,3-butanodiol foram determinantes para isso. Por fim, aqueles que apresentavam maiores concentrações relativas na LV como o acetato de isopentila, etanol, acetato de etila contribuíram para a formação desse grupo, vale destacar o  $\alpha$ -humuleno e o estireno, que mesmo em baixa concentração quando comparado com as KT, foram significativos nessa etapa.

**Figura 41** - Representação gráfica em biplot dos compostos responsáveis pela formação dos grupos.

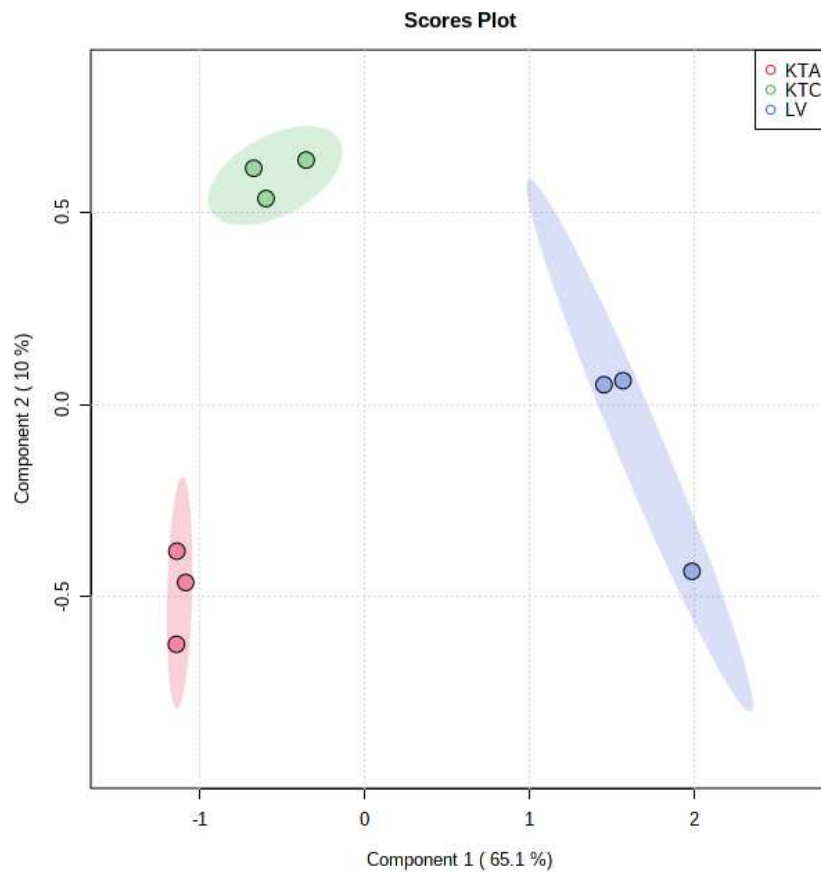


Fonte: Autora, 2022

Outra forma de avaliar a formação dos grupos é por meio da PLS-DA que se trata de um teste supervisionado entre os grupos formados na PCA. Ela possui a capacidade de reconhecer diferenças entre os grupos e intensificar a separação, isto é, a probabilidade de cada amostra se manter presente em uma determinada classe (AGNOLETTI et al., 2019, WONG et al., 2013). Dentro dessa perspectiva, é possível verificar na figura 42 a separação distinta dos grupos apresentados na figura 40. Os grupos estão representados espacialmente em: KTA quadrante inferior esquerdo da componente 1; KTC quadrante superior esquerdo da

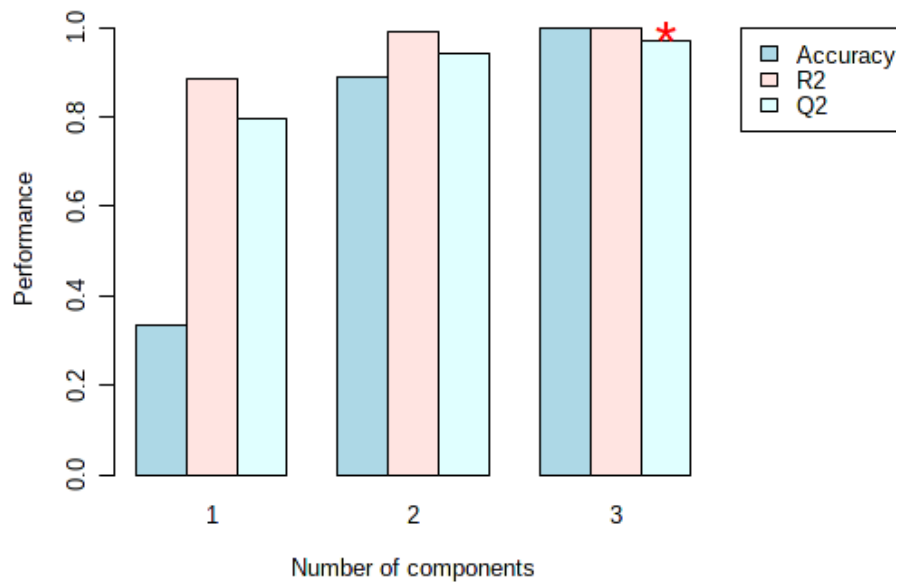
componente 1; LV se distribuiu pelos quadrantes direitos da componente 1. A figura 43, confirma que o modelo é estatisticamente favorável, pois os valores de R2 e Q2 foram superiores a 0,7, ou seja, resultado positivo em todos os grupos, apresentando melhor classificação no terceiro componente.

**Figura 42** - Representação gráfica da PLS-DA por meio de um gráfico bidimensional.



Fonte: Autora, 2022

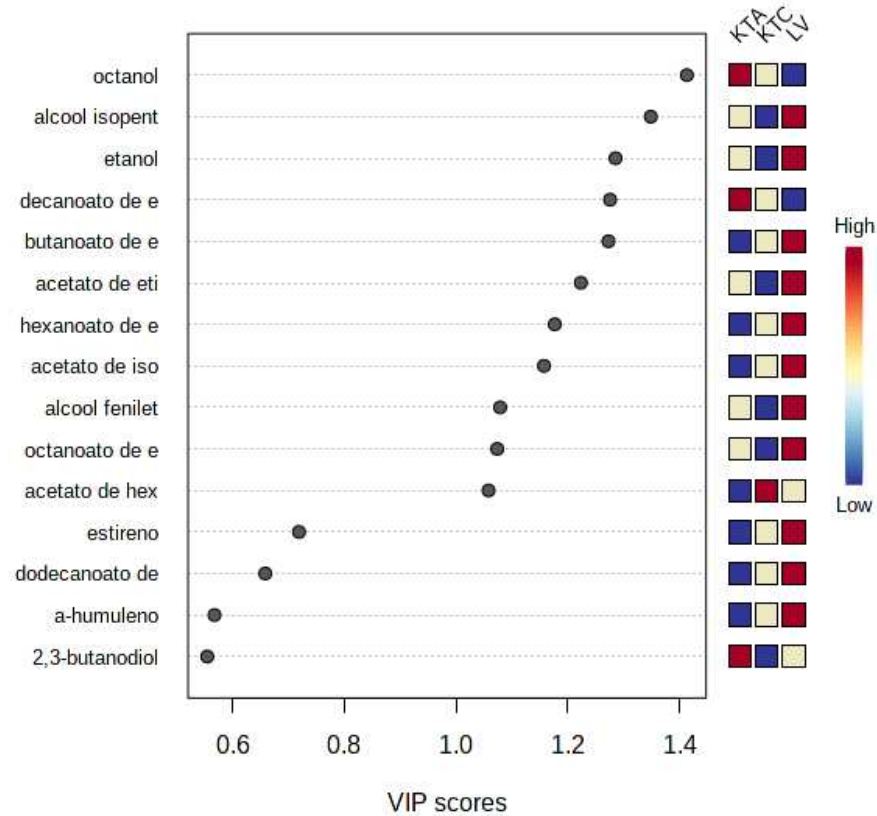
**Figura 43** - Representação gráfica da classificação da PLS-DA. A estrela vermelha indica o melhor classificador.



Fonte: Autora, 2022

No gráfico de *VIP scores* (figura 44), indicam os compostos que apresentaram maior significância para a formação do modelo PLS-DA e suas intensidades conforme cada amostra. A figura 44 retrata que as variáveis que possuem valores de *VIP scores* superiores a 1.0, foram mais importantes para a modelagem do modelo. Vale destacar que, o octanol obteve a maior pontuação, acima de 1.4, seguido pelo álcool isopentílico e pelo etanol. Analisando as áreas percentuais desses compostos na tabela 5, observa-se que o álcool isopentílico e o etanol apresentam maiores médias na LV, entretanto o octanol não é nem identificado na mesma. O estireno, dodecanoato de etila,  $\alpha$ -humuleno e 2,3-butanodiol, apresentaram menor importância para promover a formação dos grupos.

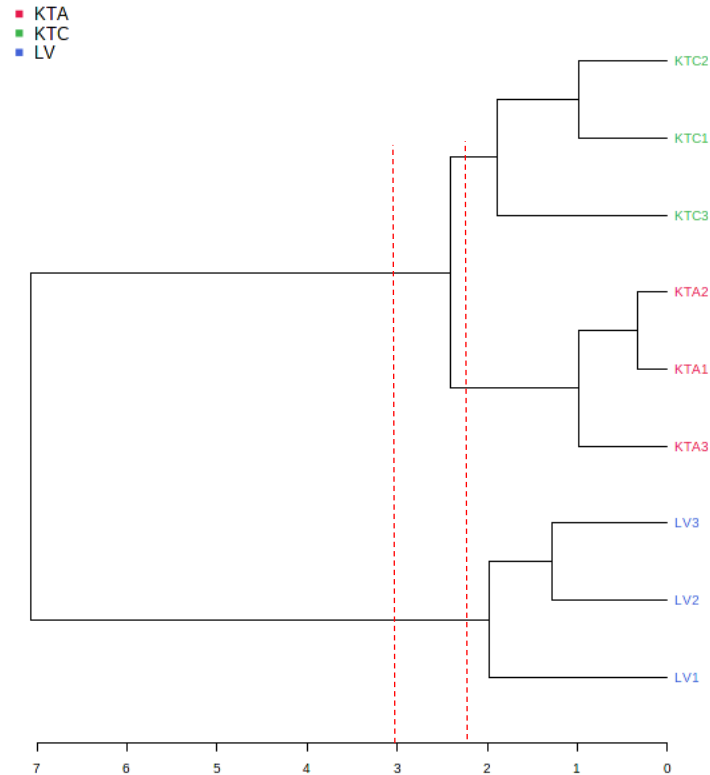
**Figura 44** - Representação gráfica em VIP scores com base no modelo PLS-DA.



Fonte: Autora, 2022

Pelo HCA é possível organizar de forma estatística as amostras, de modo a agrupar os semelhantes medindo a distância entre as particularidades de cada grupo (ALENCAR; BARROSO; ABREU, 2013). Os parâmetros utilizados para análise do HCA foram: distância Euclidiana de 7 à 0, com o algoritmo de agrupamento *Ward*. A figura 45 corrobora com os resultados em PCA e PLS-DA, na qual é possível observar em 2.2 a formação dos três grupos. KTC apresenta uma maior dissimilaridade em relação à LV e uma maior similaridade em relação à KTA. Ao aumentar o nível de distância euclidiana para 3, os grupos KTC e KTA se tornam apenas um grupo, indicando que ambas as amostras possuem maior similaridade na composição química e uma maior dissimilaridade em relação às amostras do grupo LV.

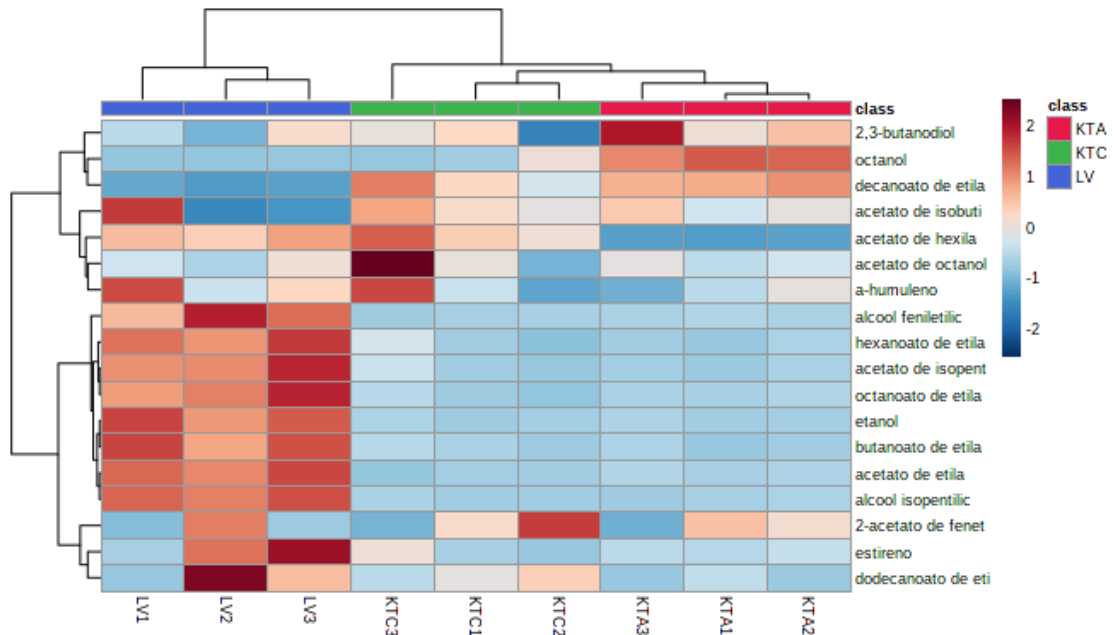
**Figura 45** - Representação gráfica da HCA por meio de um dendrograma.



Fonte: Autora, 2022

A figura 46 trata-se de um mapa de calor (*heatmap*) que utiliza de cores para facilitar o entendimento das informações e complementa os resultados da HCA. Por ela é possível relacionar a composição e a intensidade de cada composto dentro de cada grupo. É possível analisar que a LV forma blocos de coloração intensa bem distintos das KT, corroborando com a dissimilaridade estatística dessa cerveja na HCA. Entretanto, as cervejas fermentadas por Kefir já são muito similares principalmente em função do álcool fenilético, etanol, acetato de isopentila e acetato de etila, como é possível analisar. Um ponto relevante é pela diferença de coloração do 2,3-butanodiol e do 2-acetato de fenetila nas amostras KTA3 e KTC2, visto que estes podem ter sido significativos para a separação desses dois grupos, assim como o octanol e o acetato de hexila.

**Figura 46** - Representação gráfica de HCA por meio de heatmap.



Fonte: Autora, 2022

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho corrobora com os estudos que buscam inovação no mundo cervejeiro, principalmente quando deseja-se alcançar um produto com mais aceitabilidade sensorial e com benefícios à saúde. Ao utilizar a metodologia de Rodrigues et al (2016) com as otimizações necessárias, foi possível obter com êxito as cervejas desejadas dentro do estilo *Barley Wine*, entretanto, percebe-se a necessidade de otimizações no processo de fermentação e adaptação dos grãos de Kefir para aumentar a aceitação sensorial das cervejas probióticas. Por meio de HS-SPME para extração dos compostos voláteis tanto do Kefir quanto das cervejas, se mostrou uma técnica acessível principalmente ao utilizar a fibra PDMS/DVB com um tempo de extração em 50 min. Entretanto, algumas limitações podem ser destacadas como tempo de extração e necessidade de temperatura principalmente para as análises do Kefir.

Nas análises do Kefir pode-se perceber que a fermentação em 48h foi ideal para extrair os compostos presente e assim obter cromatogramas mais definidos. Dessa forma, foram identificados 13 compostos que se caracterizaram em cetonas, aldeído, ácidos e ésteres com a presença majoritária de ácido acético e acetoina, sendo estes os compostos que conferem o perfil sensorial da bebida possuindo concentrações relativas de 35,11% e 30,55% respectivamente.

Em relação a produção e análise das cervejas, observou-se uma diminuição do teor alcoólico nas cervejas fermentadas com grãos de Kefir, sendo 8,9% para a convencional e 7,3%

para a probiótica. As cervejas são ricas em álcoois e ésteres o que justifica o grande perfil sensorial da bebida e do estilo da mesma, no total foram identificadas 18 substâncias químicas na bebida sendo os majoritários o etanol, acetato de etila, álcool isopentílico e acetato de isopentila. Ao realizar a comparação das cervejas, percebeu-se que as cervejas fermentadas por Kefir possuíam uma maior composição química, sendo possível de identificar 4 compostos a mais que na convencional.

Analisando o perfil metabólico das frações das cervejas obtidas por SPE no HPLC-DAD, notou-se a presença de muitos compostos hidrofílicos, podendo ser carboidratos, açúcares, vitaminas, e ao decorrer da corrida com o aumento de B, a presença de compostos apolares. Vale ressaltar, que as análises mostraram que as cervejas possuem pequenas diferenças nos perfis de acordo com as frações estudadas. Da mesma forma, pode-se notar a presença significativa de cromóforos fortes e possíveis isômeros ao avaliar os espectros de UV das bandas cromatográficas geradas.

Ao aplicar a metodologia de Silva et al (2021), foi possível constatar que esses cromóforos se tratam de compostos fenólicos, em especial os flavonóides, principalmente ao comparar os cromatogramas e os espectros de UV. Por meio deles, foi identificado a presença de rutina nas bebidas fermentadas com Kefir em maior concentração que a cerveja convencional, entretanto, para que fosse possível identificar a presença de quercetina, seria necessária uma otimização no método. Foi também identificado a presença de outros compostos de interesse, mas, em decorrência da falta de padrões desses flavonóides, não foi possível a identificação.

Por fim, pela análise estatística multivariada, pode-se constatar que mesmo que as cervejas apresentem uma similaridade em relação a composição química, elas são diferentes em uma visão estatística. Pela PCA foi possível obter uma variância acumulada de 81,1% da PC1 e PC2. Tanto pela PCA quando PLS-DA e HCA houve a formação de três grupos distintos, KTA, KTC e LV. As duas primeiras apresentaram maior similaridade entre elas do que em comparação com a LV.

## 7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. **Allured: Carol Stream**, ed. 4.1, 2017.
- AGHLARA, A; MUSTAFA, S; MANAP, Y. A; MOHAMAD, R. Characterization of *Headspace* Volatile Flavor Compounds Formed During Kefir Production: Application of Solid Phase Microextraction. **International Journal of Food Properties**, v. 12, ed. 4, 808-818, 2009.
- AGNOLETTI, B. Z; OLIVEIRA, E. D. S; PINHEIRO, P. F; SARAIVA, S. H. Discriminação de café arábica e conilon utilizando propriedades físico-químicas aliadas à quimiometria. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 3, p. 785-805, 2019.
- ALENCAR, B. J; BARROSO, L. C; ABREU, J. F. Análise multivariada de dados no tratamento da informação espacial: uma abordagem com análise de agrupamentos. **Sistemas, Cibernética e Informática**, v. 10, n. 2, p. 1-7, 2013.
- ALMAGUER, C; SCHÖNBERGER, C; GASTL, M; ARENDT, E. K; BECKER, T. Humulus lupulus—a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289-314, 2014.
- AMBRA, R; PASTORE, G; LUCCHETTI, S. O Papel dos Compostos Fenólicos Bioativos no Impacto da Cerveja na Saúde. **Moléculas**, v. 26, 486, 2021.
- ANDRADE, M. A; LANÇAS, F. M. Estado-da-arte na análise cromatográfica de Ocratoxina A em amostras de alimentos. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 1, p. 31-52, 2015.
- ANDRÉS-IGLESIAS, C; BLANCO, C. A; BLANCO, J; MONTERO, O. Mass spectrometry-based metabolomics approach to determine differential metabolites between regular and non-alcohol beers. **Food chemistry**, v. 157, p. 205-212, 2014.
- AQUARONE, E; LIMA, U. A; BORZANI, W. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. In: Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. 1983. p. 243-243.
- ARSLAN, S. A review: chemical, microbiological and nutritional characteristics of kefir. **CyTA-Journal of Food**, v. 13, n. 3, p. 340-345, 2015.
- AZIZI, N. F; KUMAR, M. R; YEAP, S. K; ABDULLAH, J. O; KHALID, M; OMAR, A. R; OSMAN, M. A; MORTADZA, S. A. S; ALITHEEN, N. B. Kefir and its biological activities. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1210, 2021.
- BARRIONUEVO, Wilma Regina; LANÇAS, Fernando Mauro. Extração em fase sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Nova Química**, v. 24, p. 172-175, 2001.
- BATOOL, Z; LI, L; XU, D; WU, M; WENG, L; JIAO, W; CHENG, H; ROOBAB, U; ZHANG, X; LI, X; LIANG, Y; LI, B; Determination of furan and its derivatives in preserved dried fruits and roasted nuts marketed in China using an optimized HS-SPME GC/MS method. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 10, p. 2065-2077, 2020.
- BETTENHAUSEN, H. M; BARR, L; BROECKLING, C. D; CHAPARRO, J. M; HOLBROOK, C; SEDIN, D; HEUBERGER, A. L. Influência da origem do malte na química da cerveja, sabor e estabilidade do sabor. **Alimentos Res. Int.**, v. 113, 487-504, 2018.

BOGER, B., AMARAL, B. D.; ESTEVÃO, P. L. D. S.; WAGNER, R.; PERALTA-ZAMORA, P. G.; GOMES, E. C. Determination of carbamazepine and diazepam by SPE-HPLC-DAD in Belém River water, Curitiba-PR/Brazil. **Revista Ambiente & Água**, v. 13, 2018.

BONACCORSI, M. M. **Guia de estilos de cervejas: BJCP 2015**. Julho, 2018. Disponível em < <https://acervamineira.com.br/images/SiteWP/BJCP-2015-traduzido-review-julho2018-4-novos-estilos.pdf>> Acesso: 18 de outubro de 2022.

BORZANI, Walter et al. **Biotecnologia industrial-vol. 1: fundamentos**. Editora Blucher, 2001.

BRACCINI, V. P.; ARBELLO, D. D. R.; ERHARDT, M. M.; JIMÉNEZ, M. S. E.; PEDROSO, M. A. P.; RICHARDS, N. S. Leite fermentado: kefir. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 3, p. 21121-21135, 2021.

BRASIL, G. A.; SILVA-CUTINI, M. A.; MORAES, F. S. A.; PEREIRA, T. M. C.; VASQUEZ, E. C.; LENZ, D.; BISSOLI, N. S.; ENDRINGER, D. C.; DE LIMA, E. M.; BIANCARDI, V. C.; MAIA, J. F.; ANDRADE, T. U. The benefits of soluble non-bacterial fraction of kefir on blood pressure and cardiac hypertrophy in hypertensive rats are mediated by an increase in baroreflex sensitivity and decrease in angiotensin-converting enzyme activity. **Nutrition**, v. 51, p. 66-72, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 9.902, de 8 de julho de 2019**. Brasília, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017**. Brasília, 2017.

CASTRO, F. S. B. **Estratégias analíticas baseadas no emprego da extração em fase sólida para a determinação cromatográfica de contaminantes emergentes em águas naturais**. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

CHARRY-PARRA, G.; JESUS-ECHEVARRIA, M.; PEREZ, F. J. Beer volatile analysis: optimization of HS/SPME coupled to GC/MS/FID. **Journal of food science**, v. 76, n. 2, p. C205-C211, 2011.

CHEIRAN, K. P.; RAIMUNDO, V. P.; MANFROI, V.; ANZANELLO, M. J.; KAHMANN, A.; RODRIGUES, E.; FRAZZON, J. Simultaneous identification of low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 286, p. 113-122, 2019.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, v. 31, p. 623-636, 2008.

COELHO NETO, D. M.; FERREIRA, L. L. P.; DOS SANTOS SAD, C. M.; DE CASTRO, E. V. R.; BORGES, W. S.; FILGUEIRAS, P. R. P. R.; JUNIOR, V. L. Conceitos Químicos Envolvidos na Produção da Cerveja: Uma Revisão. **Rev. Virtual de Química**, v. 12, n.1, 2020.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química nova**, v. 24, p. 449-452, 2001.

DA SILVA SALES, L.; DE SOUZA, P. G. Produção de cerveja do estilo Catharina Sour com Araçá-boi (*Eugenia stipitata* McVaugh). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 1599-1613, 2021.

- DALLA SANTA, O. R et al. Elaboração de cerveja com adição de alcachofra. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 9, p. 72918-72928, 2020.
- DE SAINZ, I; REDONDO-SOLANO, M; SOLANO, G; RAMÍREZ, L. Effect of different kefir grains on the attributes of kefir produced with milk from Costa Rica. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 1, p. 215-219, 2020.
- DE SOUZA, P. G; CARVALHO, M. F. Avaliação da cerveja desenvolvida durante o processo de fermentação e maturação. **Revista Brasileira de Ciências**, v. 1, n. 2, pág. 75-81, 2022.
- DE SOUZA, R. L. Cachaça, vinho, cerveja: da Colônia ao século XX. **Revista Estudos Históricos**, v. 1, n. 33, p. 56-75, 2004.
- DENNENLÖHR, J; THÖRNER, S; MANOWSKI, A; RETTBERG, N. Analysis of selected hop aroma compounds in commercial lager and craft beers using HS-SPME-GC-MS/MS. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 78, n. 1, p. 16-31, 2020.
- DERTLI, E; ÇON, A. H. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. **LWT-Food Science and Technology**, v. 85, p. 151-157, 2017.
- DIAS, P. A; ROSA, J. V. D; TEJADA, T. S; TIMM, C. D. Propriedades antimicrobianas do kefir. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, 2016.
- DRAGONE, G; MUSSATI, S. I; SILVA, J. B. A. Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 27, p. 37-40, 2007.
- DURELLO, Renato S.; SILVA, Lucas M.; BOGUSZ, Stanislaw. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, p. 900-919, 2019.
- EBNER, J; ARSLAN, A. A; FEDOROVA, M; HOFFMANN, R; KÜÇÜKÇETIN, A; PISCHETSRIEDER, M. Peptide profiling of bovine kefir reveals 236 unique peptides released from caseins during its production by starter culture or kefir grains. **Journal of proteomics**, v. 117, p. 41-57, 2015.
- FAGHERAZZI, M. M; RUFATO, L; OLIVEIRA, B. F; STOCKHAUSEN, H; OLIVEIRA, E. R; FAGHERAZZI, A. F; ARRUDA, A. L; CAMARGO, S. S. Cervejaria artesanal: Um mercado em expansão. **Rev. UNIPLAC** 2018, 6.
- FARINI, B. W; BORGES, J. V. JANDB–Desenvolvimento de uma “Cerveja” de Malte de Arroz. **Revista da Graduação**, v. 9, n. 2, 2016.
- FERNANDEZ, C. J. M; MIRIAM, G. **Cerveja com design**. Editora Senac São Paulo, 2019.
- 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, 2019.
- FERREIRA, M. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações**. Campinas: Editora da Unicamp, 2015.
- FIORDA, F. A; DE MELO PEREIRA, G. V; THOMAZ-SOCCOL, V; RAKSHIT, S. K; PAGNONCELLI, M. G. B; DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P; SOCCOL, C. R. Microbiological, biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation-A review. **Food Microbiology**, v. 66, p. 86-95, 2017.

- FIORDA, F. A.; MELO PEREIRA, G. V.; THOMAZ-SOCCOL, V.; MEDEIROS, A. P.; RAKSHIT, S. K.; SOCCOL, C. R. Development of kefir-based probiotic beverages with DNA protection and antioxidant activities using soybean hydrolyzed extract, colostrum and honey. **LWT-Food Science and Technology**, v. 68, p. 690-697, 2016.
- GAO, X; LI, B. Chemical and microbiological characteristics of kefir grains and their fermented dairy products: A review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, n. 1, p. 1272152, 2016.
- GARROTE, G. L.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L. Preservation of kefir grains, a comparative study. **LWT-food science and technology**, v. 30, n. 1, p. 77-84, 1997.
- GHORBANI, A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 305-312, 2017.
- GIORGI, V. V. "Cultos em cerveja": discursos sobre a cerveja artesanal no Brasil. **Sociedade e Cultura**, v. 18, n. 1, p. 101-111, 2015.
- GUZEL-SEYDIM, Z; SEYDIM, A. C; GREENE, A. K. Organic acids and volatile flavor components evolved during refrigerated storage of kefir. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 2, p. 275-277, 2000.
- HOSSEINZADEH, H; NASSIRI-ASL, M. Review of the protective effects of rutin on the metabolic function as an important dietary flavonoid. **Journal of endocrinological investigation**, v. 37, n. 9, p. 783-788, 2014.
- HSIEH, H. H; WANG, S. Y; CHEN, T. L; HUANG, Y. L; CHEN, M. J. Effects of cow's and goat's milk as fermentation media on the microbial ecology of sugary kefir grains. **International journal of food microbiology**, v. 157, n. 1, p. 73-81, 2012.
- JACKSON, M. **Cerveja**: Traduzido por Marina Slade Oliveira. Zahar, ed. 2, 2010.
- JUNIOR, A. A. D; VIEIRA, A. G; FERREIRA, T. P. Processo de produção de cerveja. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 6, p. 61-71, 2009.
- KATAOKA, H; SENHOR, H. L; PAWLISZYN, J. Aplicações da microextração em fase sólida na análise de alimentos. **Journal of chromatography A**, v. 880, n. 1-2, p. 35-62, 2000.
- KEMP, N. Kefir, the champagne of cultured dairy products. **Cultured Dairy Products Journal**, 1984.
- KOETTER, U; BIENDL, M; Hops (*Humulus lupulus*): A review of its historic and medicinal uses. **HerbalGram**, v. 87, n. 5, p. 44-57, 2010.
- KONDO, Keiji. Beer and health: preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. **Biofactors**, v. 22, n. 1-4, p. 303-310, 2004.
- KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. VLB Belin, ed. 6, 2019.
- LAPCÍK, O; HILL, M; HAMPL, R; WÄHÄLÄ, K; ADLERCREUTZ, H. Identification of isoflavonoids in beer. **Steroids**, v. 63, n. 1, p. 14-20, 1998.
- LIMA, R. M. R; DO NASCIMENTO, K. K. B; DE FARIAS, V. L. Influência do tempo de fermentação nas características físico-químicas e microbiológicas de Kefir. **Brazilian Applied Science Review**, v. 3, n. 6, p. 2364-2373, 2019.
- LIUTKEVICIUS, A; ŠARKINAS, A. Studies on the growth conditions and composition of kefir grains—as a food and forage biomass. **Vet Zootec**, v. 25, p. 64-70, 2004.

- LOZANO, P. R; DRAKE, M; BENITEZ, D; CADWALLADER, K. R. Instrumental and sensory characterization of heat-induced odorants in aseptically packaged soy milk. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 8, p. 3018-3026, 2007.
- LYNCH, K. M; WILKINSON, S; DAENEN, L; ARENDT, E. K. An update on water kefir: Microbiology, composition and production. **International Journal of Food Microbiology**, v. 345, p. 109128, 2021.
- MAHATTANATAWEE, K; PEREZ-CACHO, P. R; DAVENPORT, T; ROUSEFF, R. Comparison of three lychee cultivar odor profiles using gas chromatography– olfactometry and gas chromatography– sulfur detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1939-1944, 2007.
- MA'MON, H; NUIRAT, A; ZIHLIF, M. A; TAHA, M. O. Exploring the influence of culture conditions on kefir's anticancer properties. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 5, p. 3771-3777, 2018.
- MARQUES, D. R; CASSIS, M. A; QUELHAS, J. O. F; BERTOZZI, J; VISENTAINER, J. V; OLIVEIRA, C. C; MONTEIRO, A. R. G. Characterization of craft beers and their bioactive compounds. **Chemical Engineering Transactions**, v. 57, p. 1747-1752, 2017.
- MARQUINA, D; SANTOS, A; CORPAS, I; MUNOZ, J; ZAZO, J; PEINADO, J. M. Dietary influence of kefir on microbial activities in the mouse bowel. **Letters in applied microbiology**, v. 35, n. 2, p. 136-140, 2002.
- MARTINS, C; BRANDÃO, T; ALMEIDA, A; ROCHA, S. M. Insights on beer volatile profile: Optimization of solid-phase microextraction procedure taking advantage of the comprehensive two-dimensional gas chromatography structured separation. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 12, p. 2140-2148, 2015.
- MARTINS, C; BRANDÃO, T; ALMEIDA, A; ROCHA, S. M. Unveiling the lager beer volatile terpenic compounds. **Food Research International**, v. 114, p. 199-207, 2018.
- MARTINS, J. F. L; MARINHO, E; FIRMINO, H. H; DA CRUZ RAFAEL, V; FERREIRA, C. F. Avaliação da adição do Kefir em dieta hospitalar. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 67, n. 386, p. 13-19, 2012.
- MEGA, J. F; NEVES, E; ANDRADE, C. J. A produção de cerveja no Brasil. **Revista Citino**, v. 1, n. 1, p. 34-42, 2011.
- MELLO, J. A. V. B; DA SILVA, J. L. N. Requisitos de produto para um projeto de cerveja artesanal. **Innovar**, v. 30, n. 77, p. 39-52, 2020.
- MELO, V. A; KARLS, T. S. Novas dinâmicas de lazer: as fábricas de cerveja no Rio de Janeiro do século XIX (1856-1884). **Movimento**, v. 24, p. 147-160, 2022.
- MEURER, E. C. **Espectrometria de massa para iniciantes**. 1. ed. Curitiba: Appris, p. 165, 2020.
- MOREIRA, N; MEIRELES, S; BRANDÃO, T; DE PINHO, P. G. Optimization of the HS-SPME–GC–IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers. **Talanta**, v. 117, p. 523-531, 2013.
- NARDINI, M; NATELLA, F; SCACCINI, C; GHISELLI, A. Phenolic acids from beer are absorbed and extensively metabolized in humans. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 17, n. 1, p. 14-22, 2006.

- NUTTALL, D. What are Beer Varieties? – The Origins. **JustBeer**, Acesso 15 de set. 2022. Disponível em: <<https://justbeerapp.com/article/beer-varieties-the-origins-by-david-nuttall>>, 2016.
- OLIVEIRA NETO, JR; DE OLIVEIRA, T. S; GHEDINI, P. C; VAZ, B. G; DE SOUZA GIL, E. Atividade antioxidante e vasodilatadora de cervejas. **J. Função. Alimentos**, v. 34, 130-138, 2017.
- OLIVEIRA, M; FABER, C. R; PLATA-OVIEDO, M. S. V. Elaboração de cerveja artesanal a partir da substituição parcial do malte por mel. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 6, n. 3, p. 01-10, 2015.
- OSORIO-PAZ, I; BRUNAUER, R; ALAVEZ, S. Beer and its non-alcoholic compounds in health and disease. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 20, p. 3492-3505, 2020.
- PAVIA, D. L; LAMPMAN, G. M; KRIZ, G. S; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia: Tradução da 5ª edição norte-americana**. São Paulo: Cengage Learning, 2015.
- PAVLOVIĆ, M; KOVAČEVIĆ, N; TZAKOU, O; COULADIS, M. Essential oil composition of *Anthemis triumfetti* (L.) DC. **Flavour and fragrance journal**, v. 21, n. 2, p. 297-299, 2006.
- PIMENTEL, C. É. M; SANTIAGO, I. L; OLIVEIRA, S. K. M. S; SERUDO, R. L. Produção de cerveja artesanal com adição de ácido ascórbico a partir de fruto amazônico. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 18553-18560, 2019.
- PINO, J. A; MESA, J; MUÑOZ, Y; MARTÍ, M. P; MARBOT, R. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2213-2223, 2005.
- POGAČIĆ, T; ŠINKO, S; ZAMBERLIN, Š; SAMARŽIJA, D. Microbiota of kefir grains. **Mljekarstvo**, v. 63, n. 1, p. 3-14, 2013.
- PRADO, M. A; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alimentos e nutrição**, v. 14, n. 2, p. 237-250, 2003.
- PURUTOĞLU, K; İSPIRLI, H; YÜZER, M. O; SERENCAM, H; DERTLI, E. Diversity and functional characteristics of lactic acid bacteria from traditional kefir grains. **International Journal of Dairy Technology**, v. 73, n. 1, p. 57-66, 2020.
- RANDAZZO, W; CORONA, O; GUARCELLO, R; FRANCESCA, N; GERMANÀ, M. A; ERTEN, H; MOSCHETTI, G; SETTANNI, L. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v. 54, p. 40-51, 2016.
- RAVEN, P. H; EVERT, R. F; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 7ª edição, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, P. 876. Ed. 2007.
- RIBEIRO, O. A. S; FONSECA, C. M; DE FIGUEIREDO, S. P; BOARI, C. A; NEUMANN, D; ABREU, L. R. Bebida láctea fermentada formulada com *Camellia sinensis*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 32, n. 2, 2014.
- RIU-AUMATELL, M; MIRÓ, P; SERRA-CAYUELA, A; BUXADERAS, S; LÓPEZ-TAMAMES, E. Avaliação dos perfis aromáticos de baixo teor alcoólico cervejas usando HS-SPME-GC-MS. **Alimentos Res. Int.** v. 57, 196-202, 2014

RODRIGUES, J. E; GIL, A. M. NMR methods for beer characterization and quality control. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 49, p. S37-S45, 2011.

RODRIGUES, K. L; ARAÚJO, T. H; SCHNEEDORF, J. M; FERREIRA, C. S; MORAIS, G. O. I; COIMBRA R. S; RODRIGUES, M. R. A novel beer fermented by kefir enhances anti-inflammatory and anti-ulcerogenic activities found isolated in its constituents. **Journal of functional foods**, v. 21, p. 58-69, 2016.

RODRIGUES, K. L; CAPUTO, L. R. G; CARVALHO, J. C. T; EVANGELISTA, J; SCHNEEDORF, J. M. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 5, p. 404-408, 2005.

ROSA, D. D; DIAS, M. M; GRZEŚKOWIAK, Ł. M; REIS, S. A; CONCEIÇÃO, L. L; PELUZIO, M. C. G. Kefir: nutritional, microbiological and health benefits. **Nutrition research reviews**, v. 30, n. 1, p. 82-96, 2017.

ROSA, N. A; AFONSO, J. C. A química da cerveja. **Revista Química Nova**. São Paulo, v. 37, p. 98-105, 2015.

SCHMIDT, K; PODMORE, I. D. Solid phase microextraction (SPME) method development in analysis of volatile organic compounds (VOCS) as potential biomarkers of cancer. **Journal of Molecular Biomarker & Diagnosis**, v. 6, n. 6, 2015.

SCHÖNBERGER, C; KOSTELECKY, T. 125th anniversary review: The role of hops in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 3, p. 259-267, 2011.

SCIOLI, G. et al. Artisanal fortified beers: Brewing, enrichment, HPLC-DAD analysis and preliminary screening of antioxidant and enzymatic inhibitory activities. **Food Bioscience**, v. 48, p. 101721, 2022.

SENKARCINOVA, B. et al. Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Lwt**, v. 100, p. 362-367, 2019.

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.

SERVILI, M; RIZZELLO, C. G; TATICCHI, A; ESPOSTO, S; URBANI, S; MAZZACANE, F; DI CAGNO, R. Functional milk beverage fortified with phenolic compounds extracted from olive vegetation water, and fermented with functional lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 45-52, 2011.

SHARIFI, M; MORIDNIA, A; MORTAZAVI, D; SALEHI, M; BAGHERI, M; SHEIKHI, A. Kefir: a powerful probiotics with anticancer properties. **Medical Oncology**, v. 34, n. 11, p. 1-7, 2017.

SILVA, D. **Da Cevada ao Copo: Guia completo para fazer cerveja em casa**. Condado da Cerveja. 2017.

SILVA, H. A; LEITE, M. A; PAULA, A. R. V. Cerveja e sociedade. **Contextos da Alimentação–Revista de Comportamento, Cultura e Sociedade**, v. 4, n. 2, 2016.

SILVA, M. C; DOS ANJOS, J. P; GUARIEIRO, L. L. N; MACHADO, B. A. S. A Simple Method for Evaluating the Bioactive Phenolic Compounds Presence in Brazilian Craft Beers. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4716, 2021.

SILVA, M. C; et al. A Simple Method for Evaluating the Bioactive Phenolic Compounds' Presence in Brazilian Craft Beers. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 4716, 2021.

- SILVA, P.H.A.; FARIA, F.C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 28, p. 902-906, 2008.
- SIQUEIRA, P. B; BOLINI, H. M. A; MACEDO, G. A. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 4, p. 491-498, 2009.
- TING, P. L; RYDER, D. S. The bitter, twisted truth of the hop: 50 years of hop chemistry. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 75, n. 3, p. 161-180, 2017.
- VAN DEN DOOL, H; KRATZ, P. D. A Generalization of the Retention Index System Including Linear Temperature Programmed Gas-Liquid Partition Chromatography. **Journal Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.
- VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas não alcoólicas: ciência e tecnologia**. Editora Blucher, 2010.
- VINDEROLA, C. G; DUARTE, J; THANGAVEL, D; PERDIGÓN, G; FARNWORTH, E; MATAR, C. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of dairy research**, v. 72, n. 2, p. 195-202, 2005.
- WANG, H; SUN, X; SONG, X; GUO, M. Effects of kefir grains from different origins on proteolysis and volatile profile of goat milk kefir. **Food Chemistry**, v. 339, p. 128099, 2021.
- WANNENMACHER, J; GASTL, M; BECKER, T. Phenolic substances in beer: Structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and beer quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 4, p. 953-988, 2018.
- WEISSBECKER, B; HOLIGHAUS, G; SCHÜTZ, S. Gas chromatography with mass spectrometric and electroantennographic detection: analysis of wood odorants by direct coupling of insect olfaction and mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1056, n. 1-2, p. 209-216, 2004.
- WONG, K. H; RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V; LI, K. M; LI, G. Q; CHAN, K. Differentiation of *Pueraria lobata* and *Pueraria thomsonii* using partial least square discriminant analysis (PLS-DA). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 84, p. 5-13, 2013.
- YAMAUCHI, Y; OKAMOTO, T; MURAYAMA, H; KAJINO, K; AMIKURA, T; HIRATSU, H; NAGARA, A; KAMIYA, T; INOUE, T. Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreactor. 1. Heat conversion of cw-acetolactate. **Journal of Biotechnology**, v. 38, n. 2, pág. 101-108, 1995.
- YILMAZ-ERSAN, L; OZCAN, T; AKPINAR-BAYIZIT, A; SAHIN, S. Comparison of antioxidant capacity of cow and ewe milk kefirs. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 5, p. 3788-3798, 2018.
- ZAWADZKIC A; ALLOOA C; GROSSIE A. B; DO NASCIMENTOL E. S. P; ALMEIDA L. C; BOGUSZ JUNIOR L S; SKIBSTEDD L. H; CARDOSO D. R. Effect of hop  $\beta$ -acids as dietary supplement for broiler chickens on meat composition and redox stability. **Food research international**, v. 105, p. 210-220, 2018.