

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

Guilherme Silva Dias

Estudo dos metabólitos voláteis em cervejas *ales*: Uma análise comparativa  
entre uma levedura produzida no Brasil e uma tradicional Americana

Araraquara  
2024

Guilherme Silva Dias

Estudo dos metabólitos voláteis em cervejas *ales*: Uma análise comparativa  
entre uma levedura produzida no Brasil e uma tradicional Americana

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado a Universidade Estadual  
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte  
dos requisitos para obtenção do título de  
Especialista em Tecnologia Cervejeira.

Orientador(a): Prof. Dr. Ossamu Hojo  
Co-orientador(a): Sabrina Ciane Condi

Araraquara

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

D541e	<p>Dias, Guilherme Silva</p> <p>Estudo dos metabólitos voláteis em cervejas ales: uma análise comparativa entre uma levedura produzida no Brasil e uma tradicional Americana / Guilherme Silva Dias. – Araraquara: [s.n], 2024 43 f. : il.</p> <p>Trabalho de conclusão de curso (Lato Sensu – Tecnologia Cervejeira) – Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química Orientador: Ossamu Hojo Coorientador: Sabrina Ciane Condi</p> <p>1. Brasil. 2. Cerveja. 3. Leveduras. 4. Metabólitos. 5. Cromatografia a gás. I. Título.</p>
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

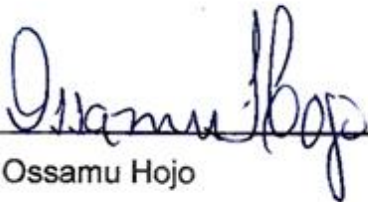
Guilherme Silva Dias

Estudo dos metabólitos voláteis em cervejas *ales*: Uma análise comparativa entre uma levedura produzida no Brasil e uma tradicional Americana

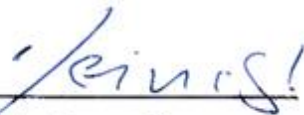
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" como parte dos requisitos para obtenção do título de Especialista em Tecnologia Cervejeira.

Araraquara, 19 de abril de 2024

**Banca examinadora**



Prof. Dr. Ossamu Hojo



Prof. Dr. Leinig Antonio Perazolli



Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha família, em especial à minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, por sempre me incentivarem a estudar. Muito obrigado por isso!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Ossamu Hojo e a minha co-orientadora Sabrina Ciane Condi por todo o suporte e apoio para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também a Startup BioSab Leveduras pela contribuição com o fornecimento da levedura utilizada neste estudo.

Agradeço a todos os professores pelo empenho em transmitir conhecimento de qualidade durante o curso e também à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) pela estrutura e ensino de excelência.

Agradeço a todos os amigos pela amizade e companheirismo estabelecidos nesta temporada. Foi um prazer conhece-los!

“Beer is a wonderful invention. It has evoked emotion and passion from the earliest days of the ancient Egyptians and Babylonians to the present day. It is a liquid that has sustained the lives of those when water was unfit to drink, it has fed armies, comforted and nourished sailors on long voyages, seen kings and queens, presidents and prohibition come and go. It is used to help people celebrate, commiserate and contemplate, and is woven into the human psyche”

(PARKER, 2012)<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> PARKER, D. K. Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis. **Alcoholic Beverages**, p. 133–158, 1 jan. 2012.

## RESUMO

O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo com uma produção de 15 bilhões de litros anuais. O setor cervejeiro no país apresentou grande expansão nos últimos anos e representa 1,6% do PIB nacional. Entretanto, mesmo com uma influência econômica tão alta, a maior parte dos insumos utilizados na produção cervejeira ainda são importados de outros países. Sendo assim, explorar matérias-primas que vêm sendo produzidas no Brasil pode levar a uma significativa contribuição para a economia nacional. Na produção de cervejas, a fermentação do mosto é um processo determinante para a qualidade da bebida, sendo que diversos produtos do metabolismo das leveduras são responsáveis por grande parte dos aromas e sabores presentes nas cervejas. O objetivo deste estudo foi comparar o perfil metabólico volátil de cervejas elaboradas com uma levedura produzida e comercializada no Brasil e uma levedura tradicional Americana (ambas *Saccharomyces cerevisiae*). A extração e análise dos voláteis foram realizadas pelas técnicas HS-SPME/GC-MS e os resultados trabalhados em combinação com análises estatísticas uni- e multivariadas na busca das principais diferenças ou similaridades entre as cervejas. A análise de PCA indicou a existência de diferenças no perfil químico entre as cervejas, o que foi confirmado pelo mapa de calor acoplado com HCA. A seleção de 25 variáveis (metabólitos) que melhor respondem pelas diferenças entre os grupos ocorreu de acordo com o valor F na análise de variância (ANOVA one-way). Os ésteres nonanoato de etila e octanoato de isoamila foram detectados apenas na cerveja produzida com a levedura US-05, assim como os metabólitos oriundos do lúpulo  $\beta$ -mircenol e geranato de metila. Além disso, esta cerveja apresentou maiores intensidades de ésteres etílicos derivados de ácidos orgânicos de cadeia média. Por outro lado, a cerveja produzida com a levedura BS-02 diferiu principalmente pela presença do éster propanoato de etila, detectado apenas nesta cerveja, mas também pela maior intensidade do álcool superior 2-feniletanol e do seu respectivo éster acetato de feniletila. Os resultados obtidos indicaram que a cerveja produzida com a levedura US-05 apresentou maiores intensidades de ésteres, sugerindo assim um perfil mais aromático principalmente com notas florais e frutadas, e nesse sentido sugere uma maior neutralidade na cerveja produzida com a levedura BS-02.

**Palavras-chave:** Brasil, cervejas, leveduras, metabólitos, cromatografia a gás.

## ABSTRACT

Brazil is the third largest beer producer in the world, with a production of 15 billion liters annually. The country's beer sector has expanded significantly in recent years and represents 1.6% of the national PIB. However, even with such a high economic influence, most of the raw materials used in beer production are still imported from other countries. Therefore, exploiting raw materials that are being produced in Brazil can make a significant contribution to the national economy. In the production of beer, the fermentation of the wort is a determining process for the quality of the drink, and various products of yeast metabolism are responsible for a large part of the aromas and flavors present in beers. This study aimed to compare the volatile metabolic profile of beers made with a yeast produced and marketed in Brazil and a traditional American yeast (both *Saccharomyces cerevisiae*). Volatiles were analyzed using HS-SPME/GC-MS techniques, and these were combined with uni- and multivariate statistical analyses to find the main differences or similarities between the beers. The PCA analysis indicated differences in the chemical profile of the beers, confirmed by the heat map coupled with HCA. The selection of 25 variables (metabolites) that best account for the differences between the groups occurred according to the F value in the analysis of variance (one-way ANOVA). The esters ethyl nonanoate and isoamyl octanoate were detected only in beer produced with US-05 yeast, as well as metabolites from hops  $\beta$ -myrcene and methyl geranate. Furthermore, this beer presented higher intensities of ethyl esters derived from medium-chain organic acids. Otherwise, the beer produced with BS-02 yeast differed mainly due to the presence of ethyl propanoate ester, detected only in this beer, but also due to the greater intensity of the higher alcohol 2-phenylethanol and phenylethyl acetate ester. The results indicated that the beer produced with the US-05 yeast presented higher ester intensities, thus suggesting a more aromatic profile, mainly with floral and fruity notes, and a greater neutrality in the beer produced with the BS-02 yeast.

**Keywords:** Brazil, beers, yeast, metabolites, gas chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Rampa de mosturação empregada no processo de produção das cervejas.....	15
<b>Figura 2:</b> Temperaturas empregadas no processo de fermentação do mosto.....	16
<b>Figura 3:</b> Curva de atenuação do mosto com o tempo de fermentação (linha verde, US-05; linha roxa, BS-02) ( <b>A</b> ). Variação da densidade e pH durante a fermentação com a levedura US-05 ( <b>B</b> ); Variação da densidade e pH durante a fermentação com a levedura BS-02 ( <b>C</b> ) .....	20
<b>Figura 4:</b> Fotografia das cervejas prontas.....	22
<b>Figura 5:</b> Gráfico de pontuação (score plot) obtido pela Análise de Componentes Principais.....	24
<b>Figura 6:</b> Mapa de calor ( <i>heatmap</i> ) com os dados obtidos nas análises GC-MS...25	25
<b>Figura 7:</b> Comparação dos cromatogramas obtidos nas análises das cervejas. O recorte com ampliação indica a detecção do éster propanoato de etila apenas na cerveja produzida com a levedura BS-02.....	29
<b>Figura 8:</b> Reação simplificada de formação do álcool 2-feniletanol a partir do aminoácido precursor fenilalanina descrito pelo mecanismo de Ehrlich.....	30
<b>Figura 9:</b> Comparação dos cromatogramas obtidos nas análises das cervejas. Os recortes com ampliação indicam a detecção do álcool 2-feniletanol e do éster acetato de feniletila em maiores intensidades na cerveja produzida com a levedura BS-02.....	31
<b>Figura 10:</b> Reação enzimática de formação do éster acetato de feniletila a partir do álcool 2-feniletanol.....	31
<b>Figura 11:</b> Comparação dos cromatogramas indicando os picos referentes aos ésteres octanoato de etila, decanoato de etila, dodecanoato de etila, hexanoato de etila e 9-decanoato de etila.....	32
<b>Figura 12:</b> Esquema simplificado para a formação dos ésteres derivados de ácidos graxos de cadeias médias.....	33
<b>Figura 13:</b> Comparação dos cromatogramas indicando a detecção dos ésteres nonanoato de etila e octanoato de isoamila apenas na cerveja produzida com a levedura US-05.....	34
<b>Figura 14:</b> Comparação dos cromatogramas indicando a detecção do monoterpeneo $\beta$ -mirceno e do éster geranato de metila apenas no mosto e na cerveja produzida com a leveduras US-05.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise da Variância
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
BU	<i>Bitterness Unit</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i>
HS-SPME	<i>Headspace- Solid Phase Microextraction</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PIB	Produto Interno Bruto
ppb	partes por bilhão
ppm	partes por milhão
SRM	Standard Reference Method

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	14
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
3.1 PRODUÇÃO DAS CERVEJAS .....	14
3.1.1 PRODUÇÃO DO MOSTO .....	14
3.1.2 FERMENTAÇÃO E ENVASE .....	15
3.2 AMOSTRAGEM DE MOSTO E CERVEJA.....	16
3.3 ANÁLISES DE COR E AMARGOR POR ESPECTROFOTOMETRIA .....	17
3.4 EXTRAÇÃO DOS VOLÁTEIS POR HS-SPME .....	17
3.5 ANÁLISES POR GC-MS .....	17
3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS.....	18
3.7 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA .....	19
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>19</b>
4.1 PERFIL DE ATENUAÇÃO DAS CERVEJAS.....	19
4.2 ANÁLISES DE COR E AMARGOR .....	21
4.3 ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS POR GC-MS .....	23
4.3.1 Principais metabólitos presentes no mosto pré-fermentação.....	27
4.3.2 Metabólitos discriminantes nas cervejas produzidas com a leveduras BS-02..	28
4.3.3 Metabólitos discriminantes nas cervejas produzidas com a leveduras US-05	32
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>
<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>42</b>
<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>43</b>

## INTRODUÇÃO

A cerveja é considerada a bebida alcoólica mais consumida no mundo. Consequentemente, o setor cervejeiro exerce grandes influências na economia mundial, contribuindo com geração de empregos e movimentação de tributos em diversos países (COLEN; SWINNEN, 2016). O Brasil ocupa a posição de terceiro maior produtor de cerveja no mundo, com a China e Estados Unidos no primeiro e segundo lugar, respectivamente. (BARTHHAAS, 2024). Atualmente, mais de 1800 cervejarias foram registradas no Brasil, sendo estas responsáveis pela produção de 15 bilhões de litros de cerveja por ano (ANUÁRIO DA CERVEJA, 2024). Este setor é responsável por 1,6% do PIB nacional com geração de R\$ 21 bilhões de impostos ao ano (CERVBRASIL, 2024). No entanto, mesmo com uma influência econômica tão alta, a maior parte dos insumos utilizados na produção cervejeira ainda são importados de outros países (GOV.BR, 2021; JORNAL DA USP, 2021).

No processo de produção das cervejas, a etapa de fermentação do mosto é imprescindível e de extrema importância para a qualidade da bebida (STEWART, 2017). Durante este processo, os açúcares fermentescíveis são convertidos em etanol, dióxido de carbono e diversas outras substâncias intermediárias, como ésteres, álcoois superiores, dicetonas vicinais, aldeídos, ácidos orgânicos, compostos sulfurosos, fenóis, dentre outros, que acabam conferindo complexidade aos aromas e sabores da bebida (CHARRY-PARRA; DEJESUS-ECHEVARRIA; PEREZ, 2011; PARKER, 2012). Cerca de 1000 metabólitos foram identificados e descritos como contribuintes dos aromas presentes em cervejas, sendo que mais de 600 são originados do metabolismo das leveduras (PARKER, 2012). Historicamente, as principais cepas de leveduras utilizadas na produção de cervejas são a *Saccharomyces cerevisiae* (*ales*) e a *Saccharomyces pastorianus* (*lagers*). Dentre elas, a linhagem das *ales* apresentam maior potencial na produção de substâncias aromáticas, como ésteres e álcoois superiores, por exemplo (MOSHER; TRANTHAM, 2017; STEWART, 2017).

Uma vez que os metabólitos produzidos durante a fermentação representam grandes influências nas características sensoriais de aroma e sabor da cerveja, é muito importante que o cervejeiro tenha conhecimento das especificações e do comportamento de cada cepa de levedura a ser utilizada no processo. Isto é

fundamental para elaboração de receitas, sendo um fator determinante para atingir um determinado perfil desejado para a cerveja.

Uma forma de investigar os compostos voláteis é através da técnica de microextração em fase sólida no modo *headspace* (HS-SPME) e subsequente análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) (LOUW, 2021). Além de realizar a extração, a técnica de HS-SPME também permite a pré-concentração dos analitos de maneira rápida e reprodutível, eliminando etapas de preparo da amostra, bem como diversos problemas associados a interferentes presentes na matriz (CHARRY-PARRA; DEJESUS-ECHEVARRIA; PEREZ, 2011). Além da robustez, praticidade e sensibilidade (com capacidade de detecção em partes por bilhão), esta técnica necessita de baixos volumes de amostras e não faz uso de solventes orgânicos (LUIZ; VALENTE; AUGUSTO, 2000), o que justifica seu amplo uso em pesquisas envolvendo voláteis em diferentes tipos de amostras, incluindo bebidas como cervejas (CHARRY-PARRA; DEJESUS-ECHEVARRIA; PEREZ, 2011; DA SILVA et al., 2015; DENNENLÖHR et al., 2020; GIANNETTI et al., 2019; JIAO et al., 2011; RIU-AUMATELL et al., 2014; SILVA; AUGUSTO; POPPI, 2008) e também vinhos (MOREIRA et al., 2018; PANIGHEL; FLAMINI, 2014; ROSSI et al., 2023; SIEBERT et al., 2005; SUN; JIANG; ZHAO, 2012; TUFARIELLO et al., 2022; XIAO et al., 2014).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar uma levedura produzida no Brasil, em relação aos metabólitos voláteis formados durante o processo de produção da cerveja. Para isto, duas cervejas (*ales*) foram produzidas utilizando uma levedura produzida e comercializada no Brasil e uma levedura tradicional Americana. O perfil químico das cervejas foi obtido por HS-SPME/GC-MS e os resultados foram analisados em combinação com análises estatísticas uni- e multivariadas, visando estabelecer as principais diferenças e/ou similaridades químicas entre as cervejas acabadas. Este estudo apresenta o potencial uso de uma levedura que vem sendo produzida no Brasil, na produção de cervejas, de modo a esclarecer seu comportamento principalmente com relação à produção de metabólitos voláteis durante o processo fermentativo. Tais resultados são valiosos para os cervejeiros e contribui com incentivo ao desenvolvimento e comercialização desta importante matéria-prima.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do trabalho foi avaliar e comparar o perfil de metabólitos voláteis formados durante o processo de produção de cervejas utilizando uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) comercial produzida no Brasil e uma tradicional Americana.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir cervejas do tipo *Pale Ale* utilizando diferentes leveduras comercialmente disponíveis, incluindo uma levedura produzida no Brasil e uma levedura Americana.
- Obter o perfil metabólico volátil das cervejas por HS-SPME/GC-MS.
- Avaliar e comparar os metabólitos produzidos pelas leveduras e relacioná-los com aspectos sensoriais.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

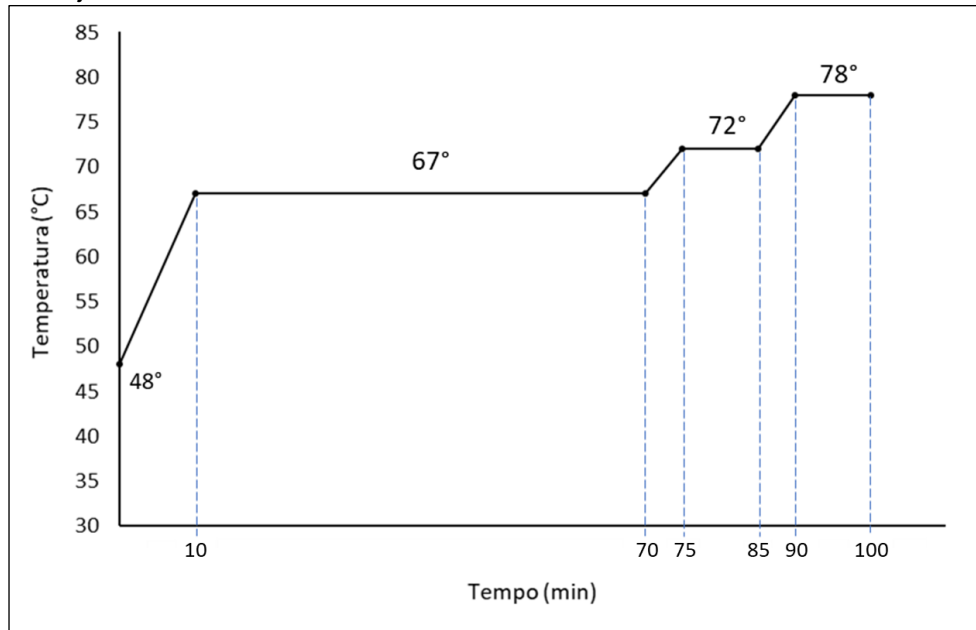
### 3.1 PRODUÇÃO DAS CERVEJAS

Uma receita de cerveja do tipo *Pale Ale* foi projetada para este estudo. A brassagem foi realizada na planta piloto localizada no Departamento de Ciências BioMoleculares da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP).

#### 3.1.1 PRODUÇÃO DO MOSTO

Um equipamento cervejeiro do tipo *single-vessel* (Braumeister 50 plus, SPEIDEL, Alemanha) foi utilizado para a produção do mosto. A mosturação (ou sacarificação) foi projetada para obtenção de 45 litros de mosto de apronte com densidade específica estimada em 1.050 g/cm<sup>3</sup>. A água utilizada na mosturação foi filtrada e suplementada com os sais CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub> e CaSO<sub>4</sub> para atingir as concentrações de 50 ppm de Ca<sup>2+</sup>, 70 ppm de SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 70 ppm de Cl<sup>-</sup> e 10 ppm de Mg<sup>2+</sup>. A base de grãos utilizada na receita foi de 100% malte de cevada do tipo *Pale Ale* (Cooperativa Agrária, Brasil). Após a devida moagem do malte em um moinho de rolos, este foi adicionado no cesto da panela contendo a água na temperatura de 48 °C. A rampa de mosturação (Figura 1) foi conduzida sob recirculação constante para melhor homogeneidade da temperatura durante o processo.

**Figura 1.** Rampa de mosturação empregada no processo de produção das cervejas.



**Fonte:** elaborada pelo autor (2024).

A aferição do pH foi realizada após 15 minutos de mosturação (mostrando estabilidade em 5,4) e o monitoramento do desempenho da sacarificação foi realizado com uso do teste de iodo. Após finalizada a mosturação, o cesto contendo o bagaço de malte foi suspenso e separado do mosto.

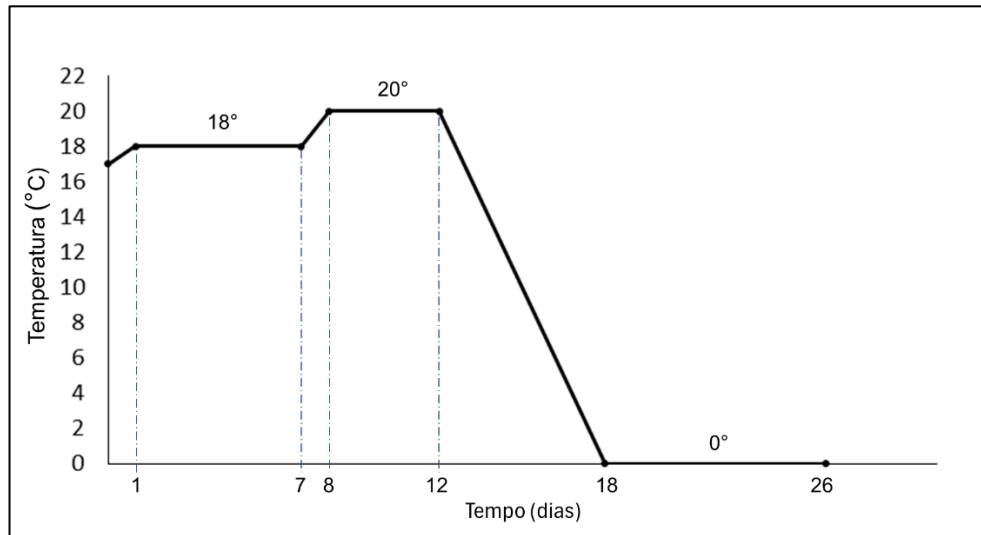
O mosto foi então submetido a etapa de fervura, sendo mantido por 60 minutos em intensa ebulição. A lupulagem de amargor foi realizada no início da fervura utilizando o lúpulo Simcoe® (*Yakima Chief Hops*), sendo estimado 20 unidades de amargor (BU) para as cervejas. Após o término da fervura, o mosto foi submetido ao *whirlpool* com auxílio de uma pá cervejeira, e em seguida resfriado com auxílio de um trocador de calor de placas com recirculação de água gelada. O mosto resfriado (com densidade original aferida em 1.050 g/cm<sup>3</sup>) foi dividido em dois tanques fermentadores do tipo cilindro-cônico auto refrigerados e em seguida aerados com oxigênio medicinal até atingir aproximadamente 10 ppm de oxigênio dissolvido antes do inóculo da levedura.

### 3.1.2 FERMENTAÇÃO E ENVASE

Duas leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) foram utilizadas neste estudo, sendo uma produzida e comercialmente disponível no Brasil (BS-02 - BioSab

Leveduras, Brasil), e uma tradicional Americana (SafAle US-05 - Fermentis, USA). A US-05 foi adquirida em forma desidratada e a BS-02 na forma líquida, sendo que a US-05 foi reidratada com água de acordo com as recomendações do fabricante 30 minutos antes do inóculo. Em cada um dos tanques contendo o mosto resfriado e aerado foi inoculado uma das leveduras na quantidade aproximada de  $7,5 \times 10^5$  células/mL/°P, calculado pela contagem com auxílio de um microscópio e câmara de Neubauer. As temperaturas empregadas na etapa de fermentação (Figura 2) foram determinadas respeitando a recomendação dos fabricantes das leveduras.

**Figura 2.** Temperaturas empregadas no processo de fermentação do mosto.



**Fonte:** elaborada pelo autor (2024).

Após o repouso do diacetil a 20°C, os tanques foram pressurizados a 1 bar de pressão utilizando um cilindro de gás carbônico, antes de dar sequência na redução da temperatura (*cold crash*). Finalizada a fermentação, as cervejas foram envasadas em barris de inox do tipo *post mix*, onde a carbonatação foi ajustada para 2,5 volumes de CO<sub>2</sub>, sendo então mantidas devidamente refrigeradas em câmara fria.

### 3.2 AMOSTRAGEM DE MOSTO E CERVEJA

Amostras do mosto resfriado (pré-inóculo da levedura) e das duas cervejas acabadas foram recolhidas para o estudo. A amostragem foi realizada recolhendo 50 mL de amostra (mosto ou cerveja) em frascos âmbar de 100 mL previamente sanitizados e purgados com CO<sub>2</sub>. Os frascos com as amostras foram vedados e congelados a - 20°C até a realização das análises. A amostragem de pequenos

volumes de mosto/cerveja foi também realizada diariamente durante a fermentação para aferição de densidade e pH.

### 3.3 ANÁLISES DE COR E AMARGOR POR ESPECTROFOTOMETRIA

Análises de cor (BEER-10, 2011) e amargor (BEER-23A, 2011) foram realizadas nas cervejas de acordo com os métodos preconizados pela *American Society of Brewing Chemists* (ASBC). Para isso foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis modelo AJX 3050 (NWT, NowLab equipamentos, Brasil).

### 3.4 EXTRAÇÃO DOS VOLÁTEIS POR HS-SPME

As extrações dos metabólitos voláteis das amostras de mosto e cervejas foram realizadas manualmente utilizando frascos âmbar de 40 mL, com tampa de rosca e septo (PTFE/silicone) e alíquotas de 1 mL de amostra previamente desgaseificada em banho de ultrassom (para as cervejas prontas). O frasco contendo amostra foi acondicionado na temperatura de 40°C em banho termostático, sob agitação magnética constante, por um tempo de equilíbrio amostras/*headspace* de 15 minutos. Um béquer encamisado foi utilizado para melhor controle da temperatura.

As extrações foram realizadas utilizando uma fibra 50/30  $\mu\text{m}$  DVB/CAR/PDMS de 2 cm (Supelco, Bellefont – PA, USA) acoplada em um suporte manual (*holder*). Após atingido o equilíbrio, a fibra foi devidamente exposta no *headspace* e a extração ocorreu por um tempo de 30 minutos na temperatura de 40°C. Após o término da extração a fibra foi retraída para posterior análise no GC-MS. Os métodos de extração e análise no GC-MS foram realizados em triplicatas.

### 3.5 ANÁLISES POR GC-MS

Após a extração, as fibras foram introduzidas no injetor do GC-MS (QP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) para a dessorção dos analitos. Uma coluna ZB-5MS (30 m x 25 mm x 25  $\mu\text{m}$ ) e as seguintes condições foram empregadas: temperatura do injetor, 250 °C; gradiente linear de temperatura de 3 °C.min<sup>-1</sup> indo de 40°(mantido por 1 min) a 196 °C, seguindo pelo aumento de 20 °C.min<sup>-1</sup> até 280 °C (mantendo por 2,8 min.) totalizando 60 minutos de corrida; gás carreador, He; temperatura do forno da coluna, 40 °C; modo de injeção, *split*; modo de controle de fluxo, velocidade linear; pressão, 15.5 kPa; fluxo total, 9,6 mL.min<sup>-1</sup>; fluxo da coluna, 0,6 mL.min<sup>-1</sup>; velocidade linear, 17,9 cm.s<sup>-1</sup>, fluxo de purga, 3,0 mL.min<sup>-1</sup> e razão

split, 10. Os espectros de massa foram adquiridos partindo de 4,5 minutos de corrida, no modo de varredura 35 e 400  $m/z$  com temperatura da fonte de íons de 250 °C e voltagem EI de 70 eV. Os cromatogramas e espectros de massa foram visualizados utilizando o software GC Solutions (versão 4.20 para Windows, Shimadzu Corporation, Quioto, Japão). Para possibilitar o cálculo dos índices de retenção, uma solução padrão de alcanos C<sub>7</sub>-C<sub>30</sub> (Supelco, Sigma-Aldrich, USA) também foi injetada durante as análises.

### 3.6 PROCESSAMENTO E ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos nas análises por GC-MS foram convertidos para o formato de arquivo \*.mzXML utilizando o software GC Solutions e depois processados no software MzMine™ (versão 3.0 para Windows, BMC Bioinformatics, Reino Unido). Os parâmetros utilizados no processamento dos dados cromatográficos encontram-se devidamente descritos no Apêndice A. Após o processamento, os dados foram exportados em planilha no formato \*.csv.

A análise dos dados foi realizada através de métodos estatísticos uni- e multivariados na plataforma online MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/MetaboAnalyst/ModuleView.xhtml>). A planilha \*.csv obtida após o processamento no MzMine™ foi carregada na plataforma com formato dos dados em intensidade dos picos e as amostras nas linhas (não pareadas). Nenhum tipo de filtragem foi aplicado e a normalização foi realizada transformando os dados para escala logarítmica ( $\text{Log}_{10}$ ) e escalonando por centralização média. Em seguida, uma análise de componentes principais (PCA) foi empregada para observar tendências de agrupamento entre as amostras. Em seguida, um mapa de calor (*heatmap*) com análise de agrupamento hierárquico (HCA) foi criado utilizando como parâmetros a medida de distância euclidiana, algoritmo de agrupamento do tipo Ward, fonte de dados normalizados e padronização pelo recurso de escala automática. A seleção de 25 variáveis (metabólitos) foi realizada de acordo com o valor F na análise de variância (ANOVA one-way). O teste *Least Significant Difference* (LSD) ao nível de significância  $p < 0,05$  foi utilizado para comparação dos valores médios.

### 3.7 IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA

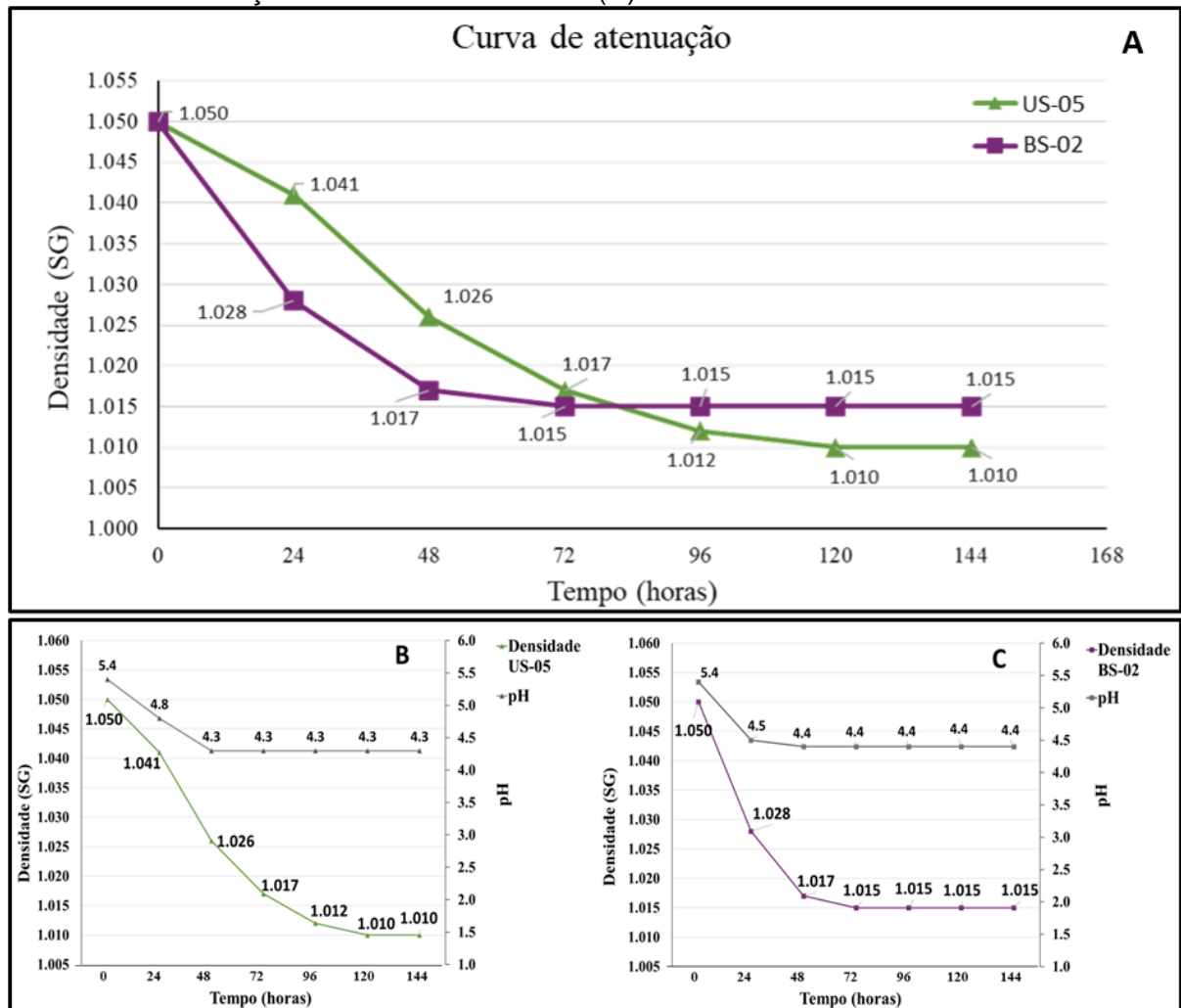
A identificação metabólica foi fundamentada pela comparação dos espectros de massa obtidos nas análises GC-MS com as bibliotecas de dados NIST (*National Institute of Standards and Technology* - 2011), Wiley e FFNSC (*Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds*), juntamente com a comparação dos índices de retenção calculado e encontrado na literatura, de acordo com van Den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL; DEC. KRATZ, 1963).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PERFIL DE ATENUAÇÃO DAS CERVEJAS

A fermentação das cervejas foi realizada a 18 °C como descrito no item 3.1.2. A atenuação do mosto com o tempo de fermentação, assim como a variação do pH durante o processo foram registrados e os resultados encontram-se na Figura 3. Observou-se a existência de diferenças nos perfis de atenuação do mosto entre as leveduras estudadas. A levedura BS-02 (produzida no Brasil) apresentou uma rápida atenuação do mosto no início da fermentação, com uma atenuação aparente de 44% após 24 horas de processo, enquanto a fermentação com a levedura US-05 apresentou 19% de atenuação no mesmo tempo.

**Figura 3.** Curva de atenuação do mosto com o tempo de fermentação (linha verde, US-05; linha roxa, BS-02) (A). Variação da densidade e pH em relação ao tempo durante a fermentação com a levedura US-05 (B). Variação da densidade e pH em relação ao tempo durante a fermentação com a levedura BS-02 (C).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Apesar de demonstrar um rápido consumo do extrato nos três primeiros dias de fermentação, a densidade específica final da cerveja produzida pela levedura BS-02 foi de 1.015 g/cm<sup>3</sup>, o que representa uma atenuação aparente de 70%. Por outro lado, a fermentação com a levedura US-5 apresentou um perfil mais brando e atingiu uma atenuação aparente de 80% ao final do processo.

São diversos os fatores que exercem influências no desempenho da fermentação, tais como a temperatura de mosturação, extrato primitivo do mosto (*Original Gravity* – OG), taxa de inóculo, viabilidade e vitalidade das leveduras,

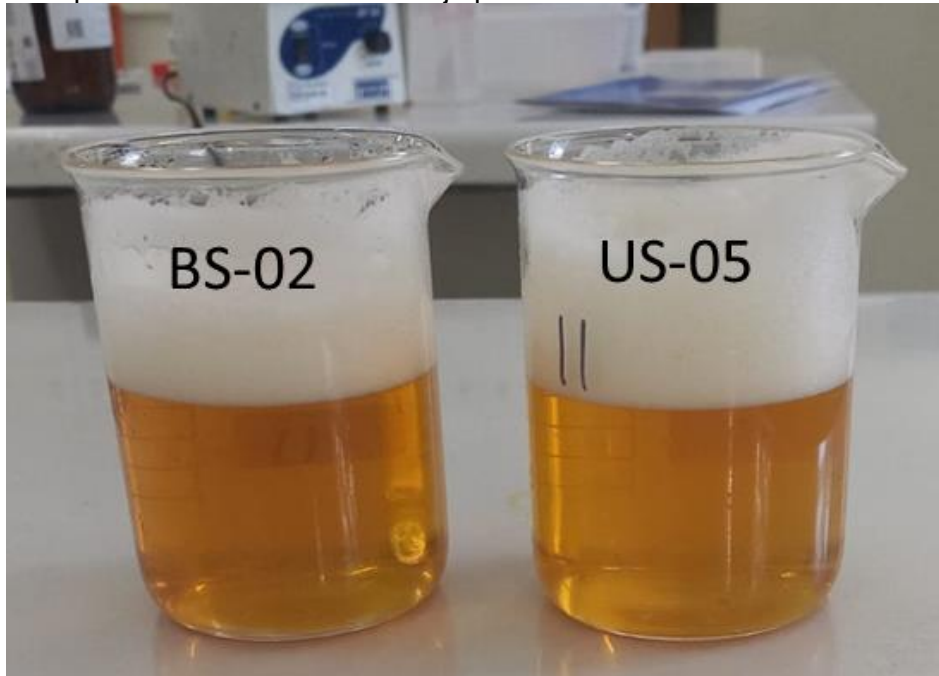
aeração, temperaturas de fermentação, disponibilidade de nutrientes e minerais, dentre outros (STEWART, 2017; WHITE; ZAINASHEFF, 2010; ZHENG et al., 1994). Porém, o fato da cerveja produzida com a levedura BS-02 ter apresentado apenas 70% de atenuação aparente pode ser consequência do meio no qual ela foi propagada para ser comercializada. Neste caso em específico, o fabricante informou que a levedura BS-02 (fornecida na forma líquida) foi propagada em um meio a base de glicose como fonte de carbono, sendo esta uma alternativa para redução de custos de produção, e que este pode ser o principal motivo para o resultado de atenuação obtido.

Além disso, foi observado que a rápida atenuação pela levedura BS-02 no primeiro dia de fermentação foi acompanhada de uma acentuada queda no valor do pH, partindo de 5,4 para 4,5 devido a intensa atividade metabólica da levedura nesta etapa. Há uma série de fatores associados ao metabolismo das leveduras que respondem pela queda do valor de pH durante a fermentação. O consumo de aminoácidos livres, fosfatos primários, como também a excreção de ácidos orgânicos, gás carbônico, mas principalmente íons  $H^+$ , representam os principais fatores responsáveis pelo decréscimo do valor de pH do meio (BAMFORTH, 2001; COOTE; KIRSOP, 1976). Dessa forma, quando a levedura cessa a atividade fermentativa, espera-se que haja estabilidade no valor de pH (desde que não ocorra fenômenos de autólise celular ou contaminações) (BOULTON; QUAIN, 2001). Além de reduzirem o pH, garantindo uma melhor estabilidade coloidal e microbiológica para as cervejas, os ácidos também contribuem com aspectos sensoriais de sabor na bebida (BAMFORTH, 2001; LI; LIU, 2015). Sendo assim, a diferença de 0,1 observada no valor de pH entre as cervejas acabadas pode ser justificada pela diferença de atenuação final aparente entre elas.

#### 4.2 ANÁLISES DE COR E AMARGOR

As análises de cor e amargor foram realizadas com as cervejas prontas (Figura 4) e os resultados encontram-se na tabela 1.

**Figura 4.** Fotografia das cervejas prontas. Como ilustrado abaixo, o béquer à esquerda contém a cerveja produzida com a levedura BS-02, e o béquer à direita contém a cerveja produzida com a levedura US-05.



**Fonte:** elaborado pelo autor (2024).

A coloração das cervejas apresentou tonalidade dourada intensa com alta similaridade entre elas, assim como a formação e retenção da espuma, a qual também apresentou similaridade entre as cervejas.

**Tabela 1.** Valores de amargor (BU) e cor (SRM) obtidos nas análises por espectrofotometria das cervejas produzidas com as leveduras BS-02 e US-05.

Levedura utilizada	Amargor (BU)	Cor (SRM)
BS-02	19.3	11
US-05	23	10.9

**Fonte:** elaborado pelo autor (2024).

A análise de cor comprovou que realmente não houve diferenças entre as cervejas. A análise de amargor apresentou valores próximos entre as cervejas e também com o valor estimado no planejamento inicial da receita. Nesse caso, pode-se concluir que as leveduras não exerceram influências significativas nos aspectos mencionados, de cor e amargor.

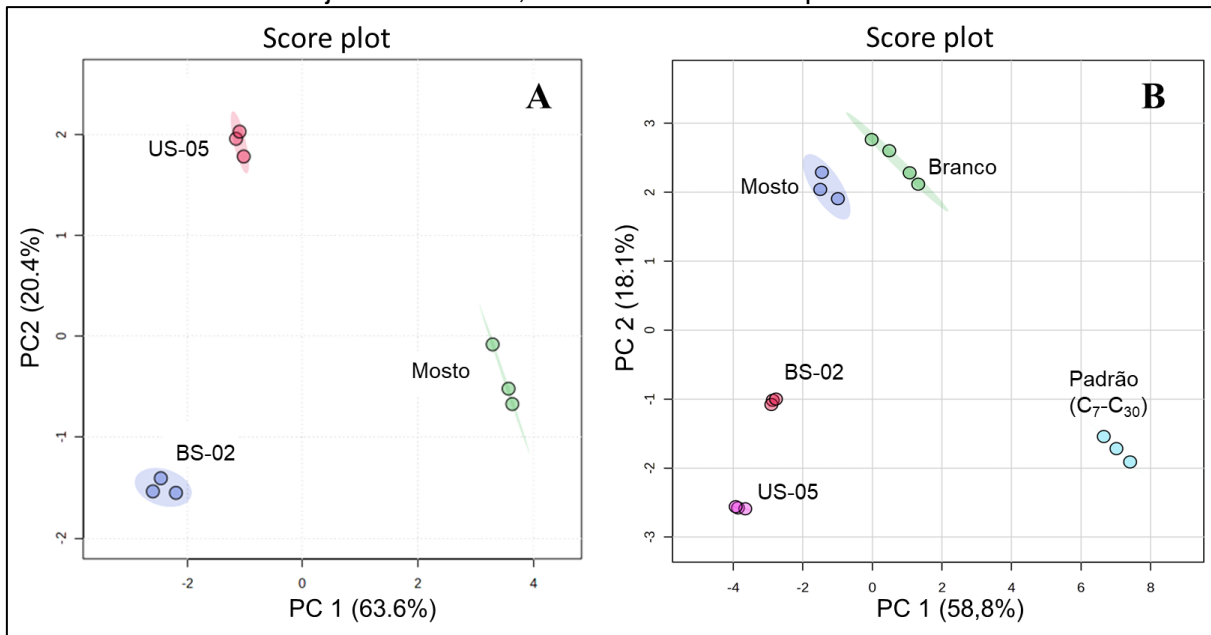
A análise de amargor pela extração com isooctano em meio ácido apresenta alta eficiência na extração dos principais responsáveis pelo sabor amargo nas

cervejas, ou seja, os iso- $\alpha$ -ácidos (ALMAGUER et al., 2014). No entanto, algumas substâncias que contribuem com amargor, como alguns produtos de oxidação dos  $\alpha$ - e  $\beta$ -ácidos do lúpulo, também são extraídos pelo solvente (HAHN et al., 2018). Uma vez que substâncias com capacidade em absorver a luz ultravioleta podem interferir na leitura, o valor de absorbância (Abs) da fase orgânica no comprimento de onda de 275 nm é multiplicado pelo fator de conversão (Abs x 50), o qual considera que aproximadamente 70% da absorbância refere-se aos iso- $\alpha$ -ácidos presentes na cerveja (HUNTER; DOMPKOWSKI, 2018). Considerando tal simplificação, a diferença de 4,3 BU observado entre as cervejas deve-se a pequenas variações nas leituras e podem ser consideradas aceitáveis, contudo, o método contribui como uma análise rápida e de grande importância para o cervejeiro.

#### 4.3 ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS POR GC-MS

Inicialmente, análises estatísticas multivariadas foram empregadas com objetivo de explorar e estabelecer correlações entre os dados referentes ao perfil químico do mosto (pré-inóculo da levedura) e das cervejas produzidas com as leveduras BS-02 e US-05. O gráfico de pontuação (Figura 5 - A) obtido pela análise de componentes principais (PCA) mostrou uma tendência de agrupamento das amostras em três grupos, referentes ao mosto, cerveja com levedura BS-02 e cerveja com levedura US-05. Além disso, as tendências de agrupamento observadas para as amostras do branco e do padrão de hidrocarbonetos (Figura 5 - B) confirmam a reprodutibilidade analítica e adequação do processamento dos dados.

**Figura 5.** Gráfico de pontuação (*score plot*) obtido pela Análise de Componentes Principais. **A**, gráfico obtido considerando apenas as amostras de mosto e cervejas. **B**, gráfico obtido considerando todo o conjunto de dados, incluindo o branco e padrão de hidrocarbonetos.



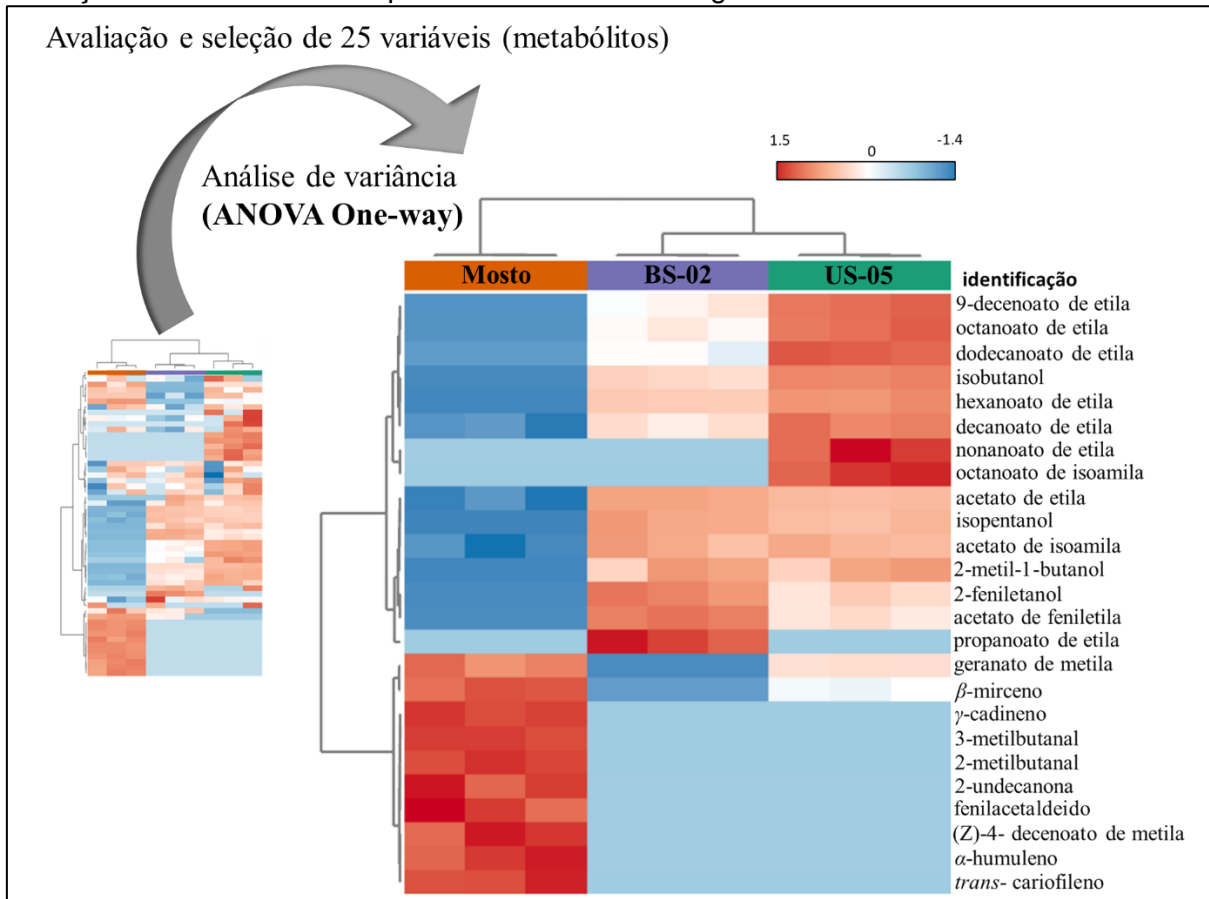
**Fonte:** elaborado pelo autor (2024).

A PCA realizada com o conjunto de dados das amostras de mosto e cervejas (Figura 5- A) é representada em função da primeira e segunda componentes (PC 1 e PC 2), as quais explicam 84% da variância entre os dados. Os agrupamentos observados na análise indicam a existência de diferenças entre o conteúdo químico do mosto com o das cervejas. Diferenças no perfil metabólico entre o mosto e a cerveja acabada deve-se principalmente aos produtos gerados pelas leveduras durante a fermentação. Apesar de ser uma observação esperada, a comparação o conteúdo químico do mosto com os das cervejas possibilita investigar o comportamento de cada levedura durante o processo fermentativo, de modo a estabelecer possíveis diferenças por perdas, produção ou biotransformação de metabólitos.

A separação das amostras de cervejas em dois grupos indica a existência de diferenças no perfil de metabólitos voláteis entre as cervejas em função da levedura utilizada. Assim, para estabelecer os metabólitos responsáveis pelas diferenças observadas, optou-se por explorar os dados de maneira mais aprofundada com o auxílio de um mapa de calor acoplado com análise de agrupamento hierárquico (Figura 6). Esta análise proporcionou uma visualização dos dados de maneira intuitiva, permitindo correlacionar as variáveis (metabólitos) com os grupos observados na PCA. O mapa de calor foi criado com todo o conjunto de dados das amostras de mosto

e cervejas, e 25 metabólitos com maiores potenciais discriminativos entre os grupos foram selecionados de acordo com o valor F obtido pela análise de variância unidirecional (ANOVA *One-way*).

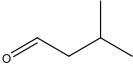
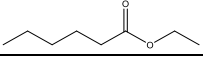
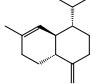
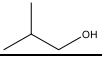
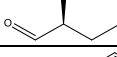
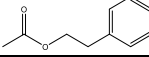
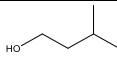
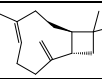
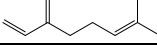
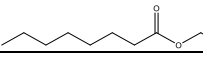
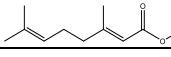
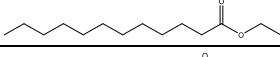
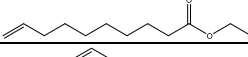
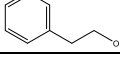
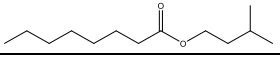
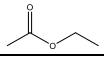
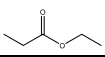
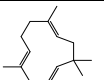
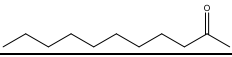
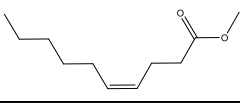
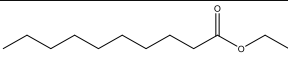
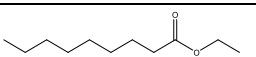
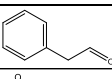
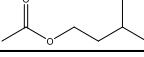
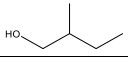
**Figura 6.** Mapa de calor (*heatmap*) com os dados obtidos nas análises GC-MS. A seleção das variáveis desejadas foi conduzida de acordo com os valores F gerados pela análise de variância unidirecional (ANOVA *One-way*). Os grupos são destacados pelas cores laranja (**mosto**), roxo (cerveja com levedura **BS-02**) e verde (cerveja com levedura **US-05**). A anotação dos metabólitos é apresentada à direita da figura.



**Fonte:** elaborado pelo autor (2024).

A identificação dos metabólitos selecionados e seus respectivos valores F obtidos na análise de variância são apresentados na Tabela 2, assim como a representação das estruturas químicas e as respectivas descrições de aromas. A identificação metabólica baseada na comparação dos valores dos índices de retenção calculados com os índices encontrados na literatura é apresentada na Tabela 1 – Apêndice B. Nesta tabela também é encontrado a classe química referente a cada um dos metabólitos selecionados.

**Tabela 2.** Identificação dos metabólitos selecionados e seus respectivos valores F obtidos na análise de variância (ANOVA *One-way*). As estruturas químicas e os descritores aromáticos para cada metabólito também são apresentados.

ID	f.value	Identificação	Estrutura química	Aroma <sup>1,2</sup>
4	5683.3	3-metilbutanal		frutado, amêndoa, torrado
24	4460.7	hexanoato de etila		frutado, maçã azeda, morango, doce
64	3966.8	$\gamma$ -cadineno		amadeirado
3	2907.6	isobutanol		álcool, solvente
5	2559.1	2-metilbutanal		maltado, doce
42	1648.5	acetato de feniletila		rosas, mel, adocicado
12	1489.5	isopentanol		álcool, solvente
56	911.04	<i>trans</i> -cariofileno		amadeirado, especiarias
23	827.31	$\beta$ -mirceno		picante, herbal, balsâmico
39	820.43	octanoato de etila		frutado, floral, doce, fresco
51	664.05	geranato de metila		floral, frutado
65	587.13	dodecanoato de etila		floral, frutado
53	517.94	9-decenoato de etila		frutado
32	485.81	2-feniletanol		mel, especiarias, rosas
57	476.12	octanoato de isoamila		frutado, doce
2	465	acetato de etila		frutado, doce, solvente
9	447.58	propanoato de etila		frutado
59	420.52	$\alpha$ -humuleno		amadeirado
45	370.16	2-undecanona		floral, frutado, laranja
49	336.1	(Z)-4- decenoato de metila		doce, caramelo, floral
54	300.76	decanoato de etila		uvas, frutado
46	277.25	nonanoato de etila		frutado
28	253.29	fenilacetaldéido		mel
17	206.35	acetato de isoamila		banana, futado
13	92.903	2-metil-1-butanol		álcool, solvente, medicinal

1.The Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals. Disponível em: <https://www.pherobase.com/> (acesso em 15 de fevereiro de 2024); 2. Acree T, Arn H. Flavornet and human odor space. Disponível em: <http://www.flavornet.org/flavornet.html>. (acesso em 15 de fevereiro de 2024). **Fonte:** elaborada pelo autor (2024).

#### 4.3.1 Principais metabólitos presentes no mosto pré-fermentação.

A análise permitiu a seleção de dez metabólitos em destaque nas amostras de mosto, correspondendo aos aldeídos 2-metilbutanal, 3-metilbutanal e fenilacetaldeído, a cetona 2-undecanona, ao éster (*Z*)-4-decenoato de metila e aos terpenoides  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -humuleno,  $\gamma$ -cadineno, *trans*-cariofileno e geranato de metila.

As principais vias de formação dos aldeídos no processo de produção de cervejas são através da oxidação de ácidos graxos insaturados, reações de Maillard, degradação (reações de Strecker) ou oxidação direta de aminoácidos (BAERT et al., 2012; DITRYCH et al., 2019). As reações de Strecker são caracterizadas pela interação de compostos dicarbonílicos (altamente reativos) com aminoácidos, gerando aldeídos como produtos. Neste caso, os aldeídos 2-metilbutanal, 3-metilbutanal e fenilacetaldeído são exemplos de produtos destas reações, sendo formados a partir dos aminoácidos isoleucina, leucina e fenilalanina, respectivamente (FERREIRA; GUIDO, 2018). A maioria dos aldeídos provenientes das reações de Strecker apresentam altos potenciais aromáticos, no entanto quando permanecem presentes após a fervura do mosto, há grande possibilidade de serem reduzidos aos seus álcoois correspondentes durante a fermentação (BRIGGS et al., 2004). Desse modo, a ausência dos aldeídos 2-metilbutanal, 3-metilbutanal e fenilacetaldeído nas amostras de cerveja sugere a ocorrência de suas respectivas reduções aos seus álcoois correspondentes (*i.e.*, 2-metil-1-butanol, isopentanol e 2-feniletanol), os quais foram detectados nas cervejas conforme observado no mapa de calor (Figura 6).

A cetona 2-undecanona, o éster (*Z*)-4-decenoato de metila e os terpenoides  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -humuleno,  $\gamma$ -cadineno, *trans*-cariofileno e geranato de metila, são todos metabólitos provenientes do lúpulo (DRESEL et al., 2015; RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018; SHARPE; LAWS, 1981). Mesmo que realizada lupulagem no início da fervura (lupulagem de 60 minutos), esses metabólitos foram capazes de resistir ao processo e permaneceram no mosto em menores concentrações. Apesar disso, perdas parciais ou totais de metabólitos oriundos do lúpulo podem ocorrer durante a fermentação por diversos fatores, como perdas por arraste com o CO<sub>2</sub> ou até mesmo por adsorção pelas células de leveduras (DIETZ et al., 2020; STEWART, 2017).

As cetonas correspondem a uma pequena fração dos metabólitos oxigenados que podem ser encontrados nos óleos voláteis dos lúpulos (SHARPE; LAWS, 1981). Em um estudo de investigação do perfil fitoquímico de híbridos experimentais e

comerciais de lúpulo, Yan *et al.* (2019) observaram que a cetona 2-undecanona foi prevalente entre as cetonas detectadas nos óleos voláteis de 30 amostras de lúpulos analisados (YAN *et al.*, 2019). No geral, elas apresentam alto potencial odorífero, caracterizado por aromas florais, frutados e cítricos, que podem ser transmitidos para as cervejas principalmente por meio de técnicas de lupulagem tardias. Conforme observado (Figura 6), a cetona 2-undecanona não foi detectada nas cervejas acabadas, indicando que perdas totais desse metabólito ocorreu durante o processo de fermentação do mosto (DIETZ *et al.*, 2020; NEVE, 1991). A mesma discussão pode ser atribuída ao éster (*Z*)-4-decenoato de metila, de aroma doce e floral. Além disso, este metabólito pode sofrer transesterificação durante o processo de fermentação e produzir seu etil éster correspondente, conferindo ainda mais complexidade ao perfil sensorial da bebida (BRIGGS *et al.*, 2004).

Dentre os terpenoides anotados, o monoterpeneo  $\beta$ -mirceno e os sesquiterpenos  $\alpha$ -humuleno e *trans*-cariofileno correspondem aos metabólitos majoritários encontrados nos óleos voláteis de lúpulos (SHARPE; LAWS, 1981). Dependendo da cultivar, esses hidrocarbonetos terpenicos podem representar de 80-90% do total da composição dos óleos de lúpulos (ALMAGUER *et al.*, 2014; DIETZ *et al.*, 2020). Por outro lado, o geranato de metila pode ser encontrado em menores concentrações tanto no lúpulo como também nas cervejas (DRESEL *et al.*, 2015; GONZALEZ VIEJO *et al.*, 2019; VAN HOLLE *et al.*, 2021).

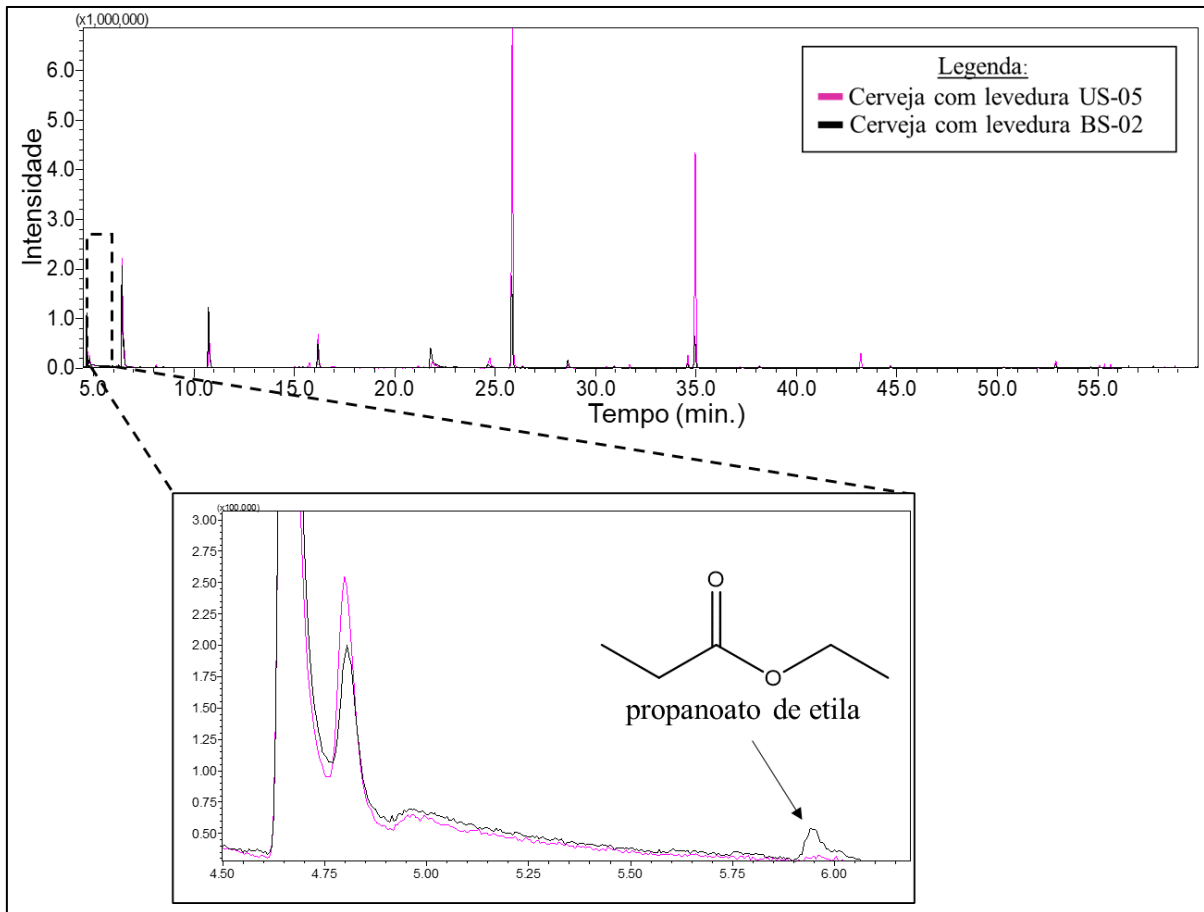
#### 4.3.2 Metabólitos discriminantes nas cervejas produzidas com a leveduras BS-02

As principais diferenças no perfil químico da cerveja produzida com a levedura BS-02 foram relacionadas à presença dos ésteres propanoato de etila e acetato de feniletila, e do álcool 2-feniletanol. Os demais metabólitos, quando presentes, apresentaram menores intensidades ou intensidades equivalentes quando comparados com os metabólitos detectados na cerveja produzida com a levedura US-05, como é o caso dos ésteres acetato de etila, acetato de isoamila e dos álcoois isopentanol e 2-metil-1-butanol, os quais não apresentaram diferenças significativas entre as duas cervejas.

A comparação entre os cromatogramas obtidos nas análises das cervejas confirma a detecção do éster propanoato de etila apenas nas cervejas produzidas com a levedura BS-02 (Figura 7), indicando ser um metabólito com alto poder para diferenciação das cervejas. Propanoato de etila apresenta grande potencial aromático

devido ao seu baixo limiar de percepção (5 ppb), tornando seu aroma frutado perceptível mesmo quando presente em baixas concentrações (MOREIRA; NETTO; DE MARIA, 2012).

**Figura 7.** Comparação dos cromatogramas obtidos nas análises das cervejas. O recorte com ampliação indica a detecção do éster propanoato de etila apenas na cerveja produzida com a levedura BS-02.



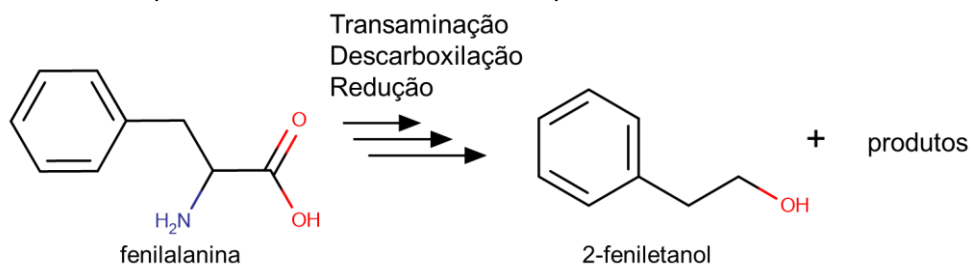
**Fonte:** elaborado pelo autor (2024).

Durante a fermentação, os álcoois superiores são formados pela via catabólica, a partir dos esqueletos de aminoácidos provenientes do mosto (mecanismo de Ehrlich), mas também pela via anabólica no metabolismo dos carboidratos (CHEN, 1978; FIX, 1999; HE et al., 2014). Na via catabólica, oxoácidos são produzidos por reações de transaminações a partir dos aminoácidos presentes no mosto. Uma vez formados, os oxoácidos são convertidos em aldeídos por descarboxilases e depois em álcool superior por álcool desidrogenases. Por outro lado, a via anabólica também pode levar a formação dos álcoois superiores a partir de oxoácidos no metabolismo dos carboidratos (FERREIRA; GUIDO, 2018). O álcool superior 2-feniletanol, por exemplo, é produzido a partir do aminoácido fenilalanina por meio de uma cascata de

reações enzimáticas envolvidas no mecanismo de Ehrlich (ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2016; FIX, 1999; PIRES et al., 2014), conforme simplificado na Figura 8.

A produção do 2-feniletanol via mecanismo de Ehrlich pode ser intensa caso haja grandes quantidades de fenilalanina disponível para levedura. No entanto, uma vez que há baixas concentrações deste aminoácido no meio, as leveduras são capazes de sintetizá-lo pela via anabólica e conseqüentemente produzir o álcool superior (GEIGER; PIENDL, 1975).

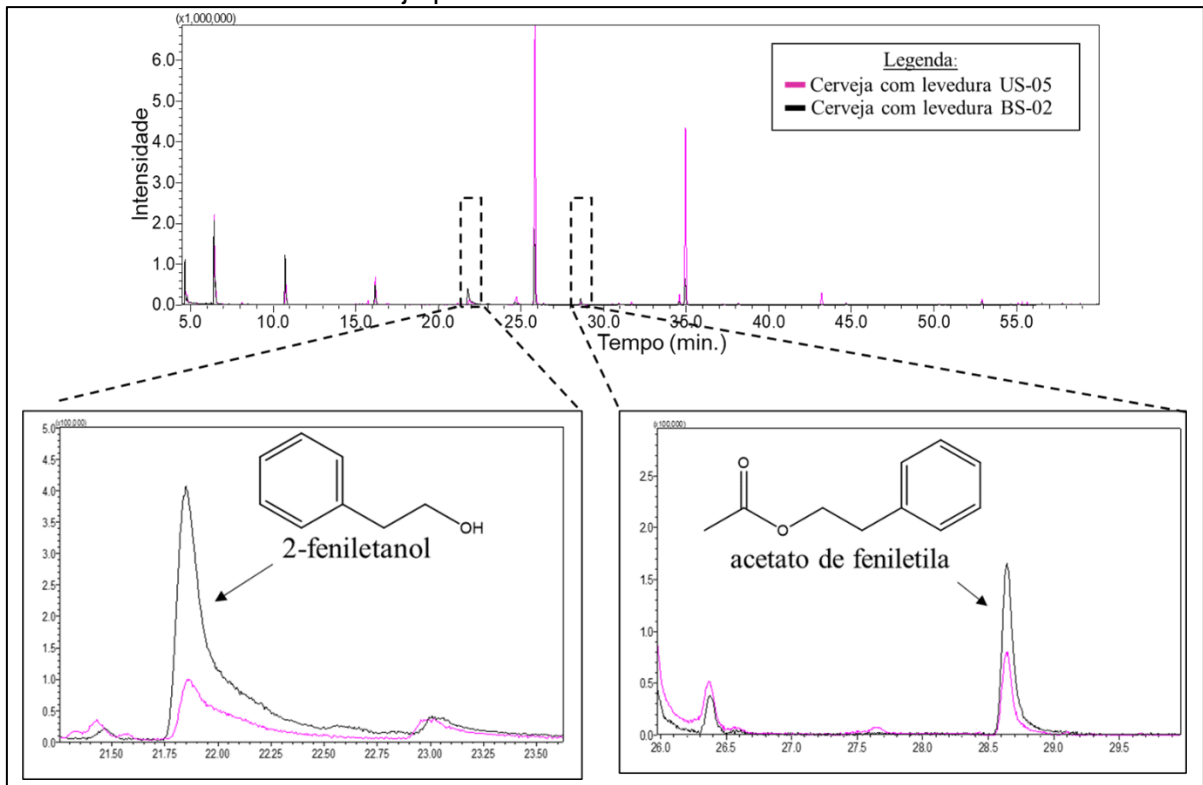
**Figura 8.** Reação simplificada de formação do álcool 2-feniletanol a partir do aminoácido precursor fenilalanina descrito pelo mecanismo de Ehrlich.



**Fonte:** elaborado pelo autor (2024).

Através da comparação dos cromatogramas (Figura 9) é possível confirmar que 2-feniletanol e acetato de feniletila apresentaram maiores intensidades na cerveja produzida com a levedura BS-02. Neste caso, os resultados sugerem uma maior produção e assimilação do aminoácido fenilalanina pela levedura BS-02, assim como a expressão das enzimas necessárias para que a produção de 2-feniletanol seja favorecida e conseqüentemente seu respectivo éster acetato de feniletila.

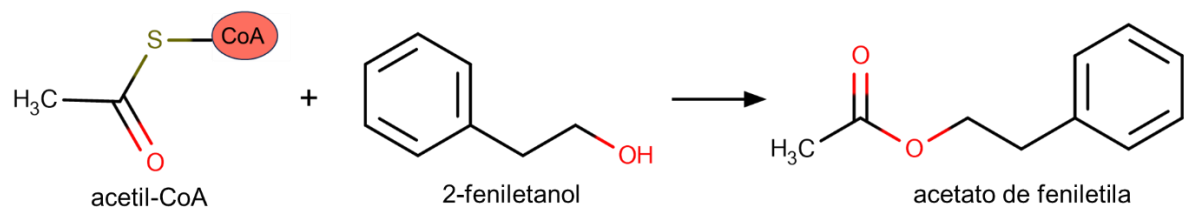
**Figura 9.** Comparação dos cromatogramas obtidos nas análises das cervejas. Os recortes com ampliação indicam a detecção do álcool 2-feniletanol e do éster acetato de feniletila em maiores intensidades na cerveja produzida com a levedura BS-02.



**Fonte:** elaborado pelo autor (2024).

O álcool superior 2-feniletanol pode ser precursor do éster acetato de feniletila por meio de uma reação enzimática com o acetil Coenzima A (Figura 10). Neste caso, a formação do acetato de feniletila é resultado da reação de esterificação do acetil-CoA com o álcool 2-feniletanol (PIRES et al., 2014).

**Figura 10.** Reação enzimática de formação do éster acetato de feniletila a partir do álcool 2-feniletanol.



**Fonte:** elaborado pelo autor (2024).

Além disso, maiores intensidades de ambos desses metabólitos (2-feniletanol e acetato de feniletia) contribuem com as características sensoriais da cerveja, atribuindo aromas adocicados e florais que remetem à mel e rosas (ANDRÉS-

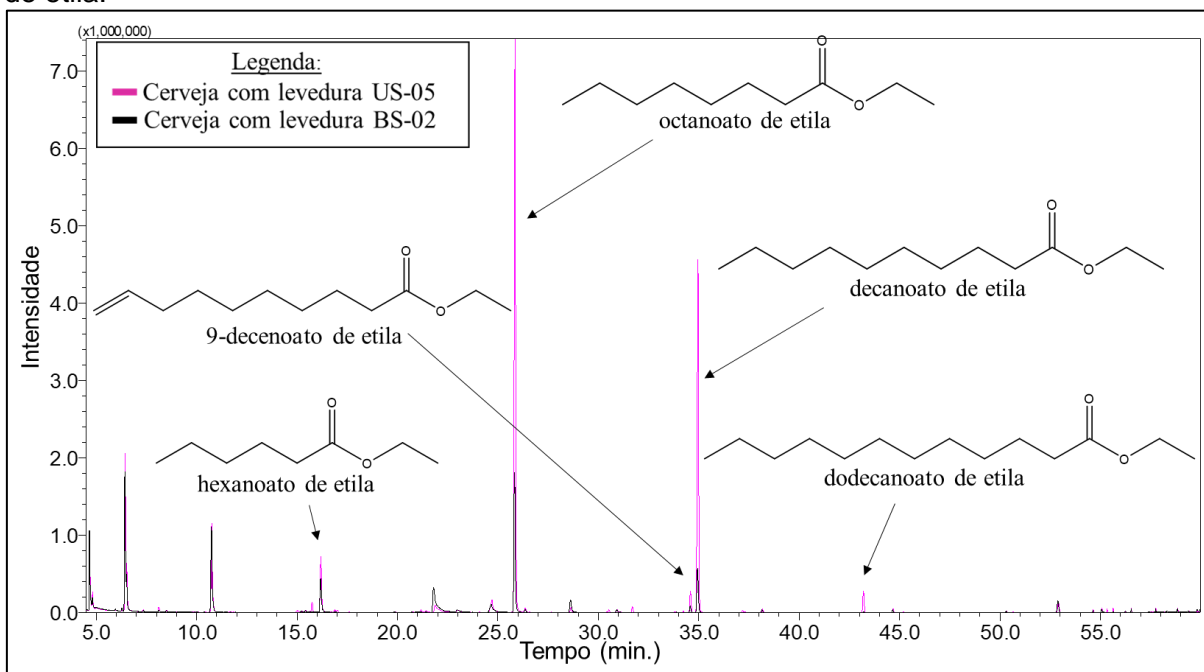
IGLESIAS et al., 2016; GEIGER; PIENDL, 1975; PIRES et al., 2014; SAERENS et al., 2008).

#### 4.3.3 Metabólitos discriminantes nas cervejas produzidas com a leveduras US-05

Conforme observado no mapa de calor (Figura 6), os metabólitos voláteis da cerveja produzida com a levedura US-05 apresentaram grandes diferenças principalmente devido aos ésteres 9-decenoato de etila, hexanoato de etila, octanoato de etila, dodecanoato de etila, decanoato de etila, nonanoato de etila, octanoato de isoamila, geranato de etila, e também ao monoterpene  $\beta$ - mirceno.

Os ésteres octanoato de etila, decanoato de etila, dodecanoato de etila, hexanoato de etila e 9-decenoato de etila foram destacados por apresentarem intensidades significativamente maiores na cerveja produzida com a US-05. Comparando os cromatogramas é possível visualizar as diferenças referentes aos metabólitos citados, conforme apresentado na Figura 11, abaixo.

**Figura 11.** Comparação dos cromatogramas indicando os picos referentes aos ésteres octanoato de etila, decanoato de etila, dodecanoato de etila, hexanoato de etila e 9-decenoato de etila.

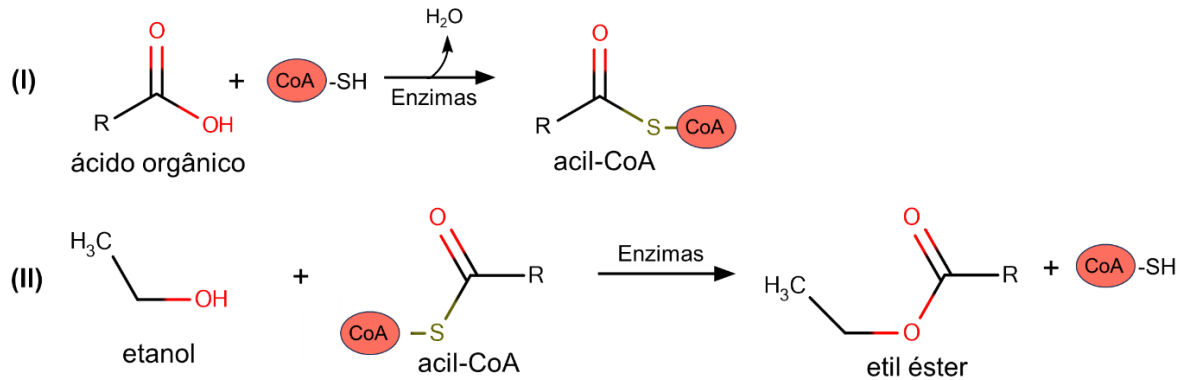


**Fonte:** elaborado pelo autor (2024).

A reação simplificada para formação de etil ésteres derivados de ácidos graxos de cadeia média é apresentada de forma simplificada na Figura 12. Primeiramente o ácido orgânico é ligado a uma coenzima A formando acil-Coa, e depois este é

esterificado enzimaticamente com etanol originando o respectivo éster de etila (PIRES et al., 2014).

**Figura 12.** Esquema simplificado para a formação dos ésteres derivados de ácidos graxos de cadeias médias. **(I)**, o ácido orgânico se liga a uma coenzima A formando acil-CoA; **(II)**, acil-CoA é esterificado enzimaticamente com etanol originando o respectivo éster de etila.



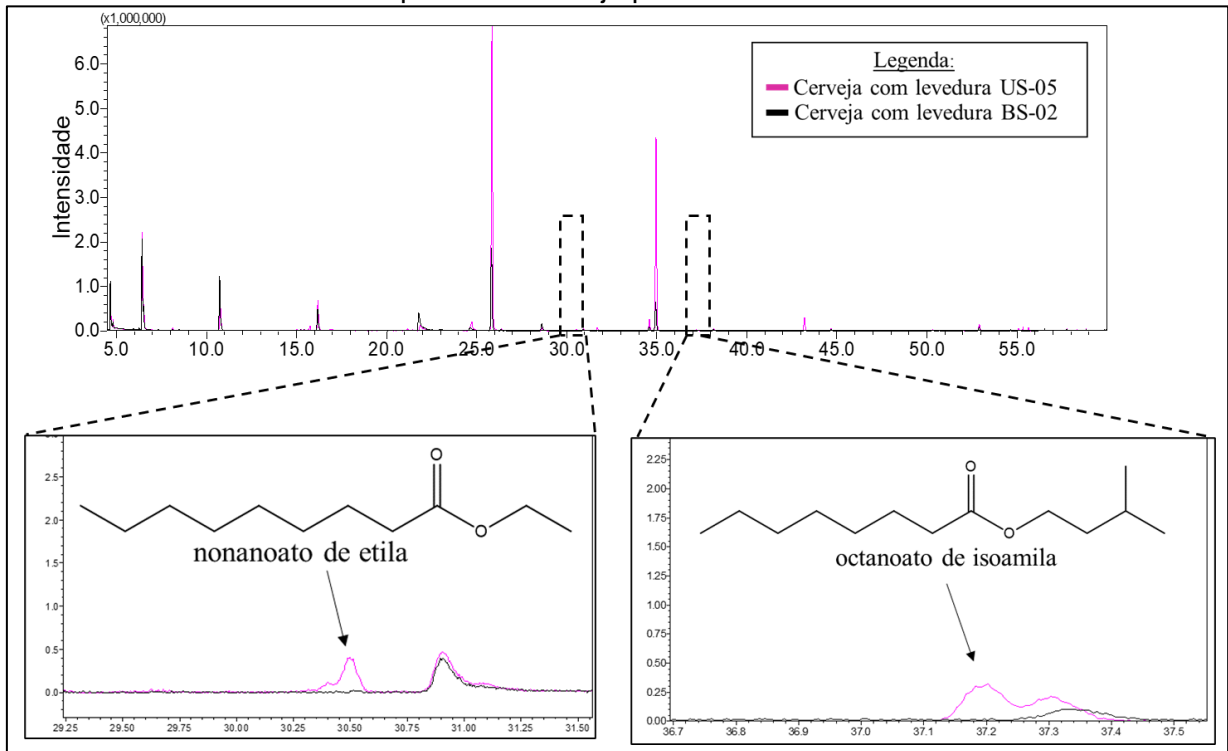
R – cadeia principal derivada dos ácidos orgânicos.

**Fonte:** elaborado pelo autor (2024).

Diversos fatores podem estar relacionados com a produção dos etil ésteres, como a disponibilidade dos precursores (coenzima A e acil-Coa) e também a atividade enzimática das enzimas envolvidas na biossíntese. Além disso, a cepa de levedura como também a composição do mosto e as condições empregadas na fermentação exercem grandes influências na produção geral dos ésteres (BRIGGS et al., 2004; HU et al., 2018; SAERENS et al., 2008; STEWART, 2017).

Outra diferença observada na comparação do perfil químico das cervejas foi a presença dos ésteres nonanoato de etila e octanoato de isoamila, os quais foram detectados apenas na cerveja produzida com a levedura US-05 (Figura 13). O éster octanoato de isoamila pode ter sido formado por meio da reação enzimática envolvendo o precursor octanoil-CoA com o álcool superior isoamílico. O álcool isoamílico (ou isopentanol) é derivado do aminoácido leucina (FERREIRA; GUIDO, 2018) e também foi detectado em ambas as cervejas em intensidades equivalentes.

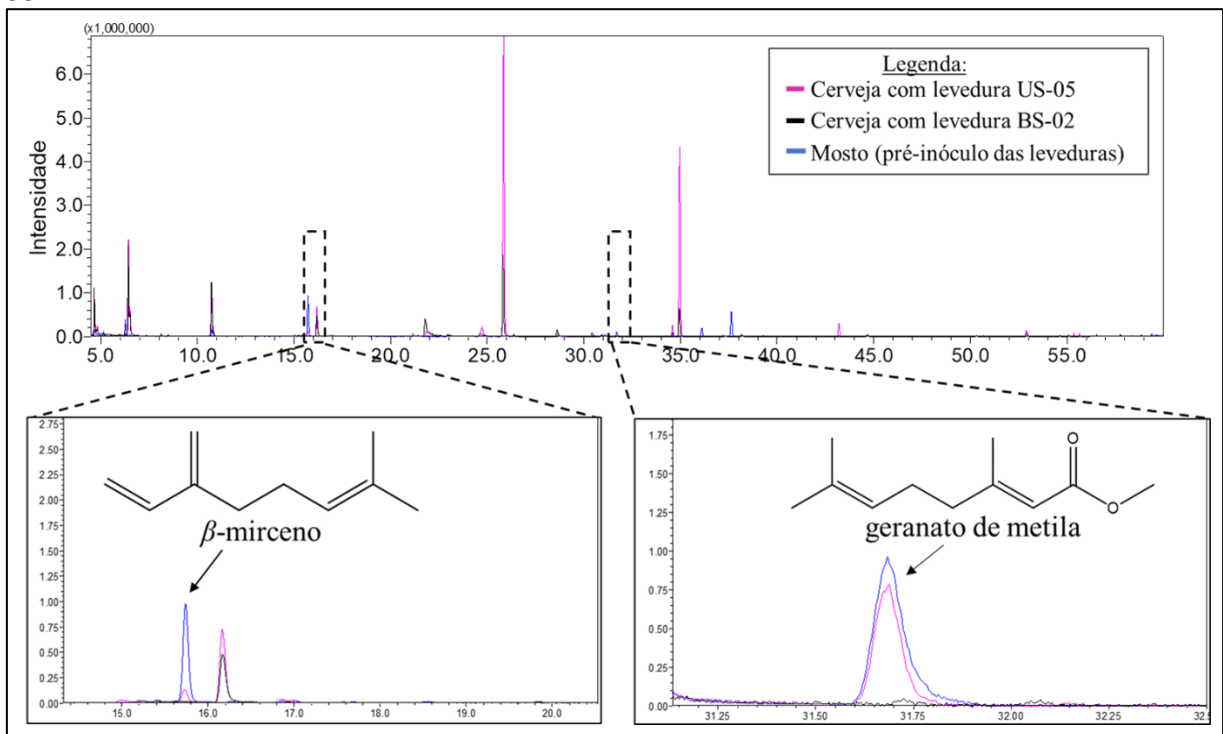
**Figura 13.** Comparação dos cromatogramas indicando a detecção dos ésteres nonanoato de etila e octanoato de isoamila apenas na cerveja produzida com a levedura US-05.



**Fonte:** elaborado pelo autor (2024).

Uma observação interessante e evidente no mapa de calor (Figura 6) foi a presença dos metabólitos derivados do lúpulo,  $\beta$ -mirceno e geranato de metila. Estes metabólitos, presentes em maiores intensidades no mosto, foram detectados apenas na cerveja produzida com a levedura US-05 (Figura 14). A ausência deles na cerveja produzida com BS-02 pode ser consequência da sua fermentação vigorosa conforme observado no perfil de atenuação do mosto (item 4.1). Perdas totais de ambos os metabólitos pode ter ocorrido juntamente com a intensa liberação de  $\text{CO}_2$  nos três primeiros dias de fermentação (DIETZ et al., 2020; RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018). A alta volatilidade do  $\beta$ -mirceno e também sua adsorção pela superfície apolar das células de leveduras ocasionam uma maior perda deste metabólito quando comparado com geranato de metila (DIETZ et al., 2020). No entanto, o perfil brando na atenuação do mosto pela US-05 possibilitou a retenção desses metabólitos na cerveja acabada.

**Figura 14.** Comparação dos cromatogramas indicando a detecção do monoterpene  $\beta$ -mirreno e do éster geranato de metila apenas no mosto e na cerveja produzida com a leveduras US-05.



**Fonte:** elaborado pelo autor (2024).

A presença do monoterpene  $\beta$ -mirreno na cerveja pode contribuir com aromas resinosos bem característico do lúpulo, agregando uma maior percepção de frescor na bebida (RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018), enquanto que o éster geranato de metila é capaz de conferir aromas florais e frutados. Geranato de metila é formado por reações de oxidação do monoterpene geraniol, o qual produz o ácido gerânico que posteriormente é esterificado em geranato de metila (SANEKATA et al., 2023).

No geral, a cerveja produzida com a levedura US-05 apresentou um perfil químico com mais metabólitos pertencentes à classe dos ésteres quando comparado com o perfil obtido pela levedura BS-02. Os etil ésteres foram responsáveis pelas principais diferenças observadas, com maiores intensidades principalmente dos ésteres octanoato e decanoato de etila na cerveja produzida com a US-05. Considerando seus baixos limiares de percepção, os ésteres de etila apresentam altos potenciais aromáticos, podendo impactar diretamente no caráter sensorial da bebida conferindo aromas adocicados que remetem principalmente a flores e frutas (BOULTON; QUAIN, 2001; HE et al., 2014; HU et al., 2018; PIRES et al., 2014; STEWART, 2017; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram a existência de diferenças significativas no perfil de metabólitos voláteis entre as cervejas produzidas com as leveduras US-05 e BS-02. A cerveja produzida com a levedura US-05 apresentou um conteúdo químico com maiores intensidades de etil ésteres derivados de ácidos orgânicos de cadeias médias, com destaque ao octanoato de etila, decanoato de etila, dodecanoato de etila, hexanoato de etila e 9-decenoato de etila. Além disso, os ésteres nonanoato de etila e octanoato de isoamila foram detectados apenas na cerveja com a levedura US-05, assim como os metabólitos provenientes do lúpulo  $\beta$ -mirceno e geranato de metila, os quais foram detectados em menores intensidades mesmo após o processo de fermentação. Por outro lado, a cerveja produzida com a levedura BS-02 foi caracterizada principalmente pela presença do éster propanoato de etila, o qual foi detectado apenas nesta cerveja, mas também pela maior intensidade do álcool superior 2-feniletanol e do éster acetato de feniletila.

A correlação dos metabólitos com suas respectivas descrições de aromas infere que, devido ao perfil com maiores intensidades de metabólitos pertencentes à classe dos ésteres, a cerveja produzida com a levedura US-05 possa apresentar aromas mais intensos principalmente com notas florais e frutadas, e nesse sentido, sugere uma maior neutralidade na cerveja produzida com a levedura BS-02. Tais resultados indicam que a levedura produzida no Brasil (BS-02) apresenta potencial para produção de cervejas de perfil aromático mais neutro. No entanto, para uma confirmação de tal hipótese seria interessante a aplicação de análises sensoriais envolvendo painéis treinados, de modo a promover a integração de dados sensoriais com o conteúdo químico gerado por diferentes leveduras durante a produção das cervejas.

## REFERÊNCIAS

- ALMAGUER, C. et al. 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.
- ANDRÉS-IGLESIAS, C. et al. Volatile Compound Profiling in Commercial Lager Regular Beers and Derived Alcohol-Free Beers After Dealcoholization by Vacuum Distillation. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 11, p. 3230–3241, 1 nov. 2016.
- ANUÁRIO DA CERVEJA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/com-1-847-cervejarias-registradas-no-brasil-setor-cresce-6-8-em-2023>>. Acesso em: 14 maio. 2024.
- BAERT, J. J. et al. On the origin of free and bound staling aldehydes in beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 46, p. 11449–11472, 21 nov. 2012.
- BAMFORTH, C. pH in Brewing: An Overview. **Technical Quarterly**, v. 38, p. 1–9, 2001.
- BARTHHAAS. **BarthHaas Report**. Disponível em: <<https://www.barthhaas.com/resources/barthhaas-report#!beer-production>>. Acesso em: 14 mar. 2024.
- BEER-10. **American Society of Brewing Chemists (ASBC Method of Analysis-Color)**. ASBC: St. Paul, MN, 2011.
- BEER-23A. **American Society of Brewing Chemists (ASBC Method of Analysis-Bitterness Unit)**. ASBC: St. Paul, MN, 2011.
- BOULTON, CHRIS.; QUAIN, DAVID. **Brewing yeast and fermentation**. [s.l.] Blackwell Science, 2001.
- BRIGGS, D. E. et al. **Brewing: science and practice**. [s.l.] CRC Press, 2004.
- CERVBRASIL. **Dados do setor-Associação Brasileira da Indústria da Cerveja**. Disponível em: <[http://www.cervbrasil.org.br/novo\\_site/dados-do-setor/](http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/)>. Acesso em: 14 mar. 2024.
- CHARRY-PARRA, G.; DEJESUS-ECHEVARRIA, M.; PEREZ, F. J. Beer Volatile Analysis: Optimization of HS/SPME Coupled to GC/MS/FID. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 2, p. C205–C211, 1 mar. 2011.
- CHEN, E. C.-H. The Relative Contribution of Ehrlich and Biosynthetic Pathways to the Formation of Fusel Alcohols. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 36, n. 1, p. 39–43, jan. 1978.
- COLEN, L.; SWINNEN, J. Economic Growth, Globalisation and Beer Consumption. **Journal of Agricultural Economics**, v. 67, n. 1, p. 186–207, 1 fev. 2016.
- COOTE, N.; KIRSOP, B. H. Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 82, n. 3, p. 149–153, 1976.

- DA SILVA, G. C. et al. Method development by GC–ECD and HS-SPME–GC–MS for beer volatile analysis. **Food Chemistry**, v. 167, p. 71–77, 15 jan. 2015.
- DENNENLÖHR, J. et al. 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, 2 jan. 2020.
- DIETZ, C. et al. The multisensory perception of hop essential oil: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 126, n. 4, p. 320–342, 2020.
- DITRYCH, M. et al. Investigating the evolution of free staling aldehydes throughout the wort production process. **BrewingScience**, v. 72, p. 10–17, 2019.
- DRESEL, M. et al. Comparison of the analytical profiles of volatiles in single-hopped worts and beers as a function of the hop variety. **Brewing Science**, p. 8, 2015.
- FERREIRA, I. M.; GUIDO, L. F. Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review. **Fermentation**, v. 4, n. 2, p. 23, 28 mar. 2018.
- FIX, G. J. **Principles of Brewing Science: A Study of Serious Brewing Issues**. [s.l.] Brewers Publications, 1999. v. Second edition
- GEIGER, E.; PIENDL, A. Technological Influences on the Formation of 2-Phenylethanol during Fermentation. **American Society of Brewing Chemists**, v. 33, n. 2, p. 48–54, jun. 1975.
- GIANNETTI, V. et al. Flavour component analysis by HS-SPME/GC–MS and chemometric modeling to characterize Pilsner-style Lager craft beers. **Microchemical Journal**, v. 149, p. 103991, 1 set. 2019.
- GONZALEZ VIEJO, C. et al. Chemical characterization of aromas in beer and their effect on consumers liking. **Food Chemistry**, v. 293, p. 479–485, 30 set. 2019.
- GOV.BR. **Mercado cervejeiro cresce no Brasil e aumenta interesse pela produção nacional de lúpulo e cevada**. Disponível em: <<https://www.gov.br/pt-br/noticias/agricultura-e-pecuaria/2021/08/mercado-cervejeiro-cresce-no-brasil-e-aumenta-interesse-pela-producao-nacional-de-lupulo-e-cevada>>. Acesso em: 15 mar. 2024.
- HAHN, C. D. et al. Evaluation of Nonvolatile Chemistry Affecting Sensory Bitterness Intensity of Highly Hopped Beers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 13, p. 3505–3513, 4 abr. 2018.
- HE, Y. et al. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer - A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 3, p. 157–163, 1 jun. 2014.
- HU, K. et al. Increase of medium-chain fatty acid ethyl ester content in mixed H. uvarum/S. cerevisiae fermentation leads to wine fruity aroma enhancement. **Food Chemistry**, v. 239, p. 495–501, 15 jan. 2018.

HUNTER, R. A.; DOMPKOWSKI, E. J. Quantifying Beer Bitterness: An Investigation of the Impact of Sample Preparation. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 11, p. 2009–2012, 13 nov. 2018.

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

JORNAL DA USP. **Essencial na produção de cerveja, lúpulo brasileiro é tão bom quanto o importado, mostram estudos da USP – Jornal da USP**. Disponível em: <<https://jornal.usp.br/ciencias/essencial-na-producao-de-cerveja-lupulo-brasileiro-e-tao-bom-quanto-o-importado-mostram-estudos-da-usp/>>. Acesso em: 15 mar. 2024.

LI, H.; LIU, F. Changes in Organic Acids during Beer Fermentation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 73, n. 3, p. 275–279, 2015.

LOUW, S. Recent trends in the chromatographic analysis of volatile flavor and fragrance compounds: Annual review 2020. **Analytical Science Advances**, v. 2, n. 3–4, p. 157–170, 1 abr. 2021.

LUIZ, A.; VALENTE, P.; AUGUSTO, F. Microextração por Fase Sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, 2000.

MOREIRA, N. et al. Development and optimization of a HS-SPME-GC-MS methodology to quantify volatile carbonyl compounds in Port wines. **Food Chemistry**, p. 518–526, 2018.

MOREIRA, R. F. A.; NETTO, C. C.; DE MARIA, C. A. B. A fração volátil das aguardentes de cana produzidas no Brasil. **Quim. Nova**, v. 35, n. 9, p. 1819–1826, 2012.

MOSHER, M.; TRANTHAM, K. **Brewing Science: A Multidisciplinary Approach**. [s.l.: s.n.].

NEVE, R. A. **Hops**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991.

PANIGHEL, A.; FLAMINI, R. Applications of Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME-GC/MS) in the Study of Grape and Wine Volatile Compounds. **Molecules 2014, Vol. 19, Pages 21291-21309**, v. 19, n. 12, p. 21291–21309, 18 dez. 2014.

PARKER, D. K. Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis. **Alcoholic Beverages**, p. 133–158, 1 jan. 2012.

PIRES, E. J. et al. Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1937–1949, 3 mar. 2014.

RETTBERG, N.; BIENDL, M.; GARBE, L. A. Hop aroma and hoppy beer flavor: Chemical backgrounds and analytical tools—A review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 76, n. 1, p. 1–20, 2018.

RIU-AUMATELL, M. et al. Assessment of the aroma profiles of low-alcohol beers using HS-SPME–GC-MS. **Food Research International**, v. 57, p. 196–202, 1 mar. 2014.

ROSSI, L. et al. Optimization of HS-SPME-GC/MS Analysis of Wine Volatiles Supported by Chemometrics for the Aroma Profiling of Trebbiano d'Abruzzo and Pecorino White Wines Produced in Abruzzo (Italy). **Molecules**, v. 28, n. 4, 1 fev. 2023.

SAERENS, S. M. G. et al. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 2, p. 454–461, jan. 2008.

SANEKATA, A. et al. Interesting Behavior of Geranic Acid during the Beer Brewing Process: Why Could Geranic Acid Remain at a Higher Level Only in the Beer Using Sorachi Ace Hops? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, n. 47, p. 18489–18498, 29 nov. 2023.

SHARPE, F. R.; LAWS, D. R. J. The essential oil of hops: A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 87, n. 2, p. 96–107, 1981.

SIEBERT, T. E. et al. Stable isotope dilution analysis of wine fermentation products by HS-SPME-GC-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 4, p. 937–947, 20 fev. 2005.

SILVA, G. A. DA; AUGUSTO, F.; POPPI, R. J. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS–SPME–GC. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 1057–1063, 15 dez. 2008.

STEWART, G. G. **The Yeast Handbook: Brewing and Distilling Yeasts**. [s.l.: s.n.].

SUN, S. Y.; JIANG, W. G.; ZHAO, Y. P. Comparison of aromatic and phenolic compounds in cherry wines with different cherry cultivars by HS-SPME-GC-MS and HPLC. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 1, p. 100–106, 1 jan. 2012.

TUFARIELLO, M. et al. Use of Multivariate Statistics in the Processing of Data on Wine Volatile Compounds Obtained by HS-SPME-GC-MS. **Foods 2022, Vol. 11, Page 910**, v. 11, n. 7, p. 910, 22 mar. 2022.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. C, p. 463–471, 1963.

VAN HOLLE, A. et al. Relevance of hop terroir for beer flavour. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 127, n. 3, p. 238–247, 2021.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast : the practical guide to beer fermentation**. [s.l.] Brewers Publications, 2010.

XIAO, Z. et al. Discrimination of Cherry Wines Based on Their Sensory Properties and Aromatic Fingerprinting using HS-SPME-GC-MS and Multivariate Analysis. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 3, 2014.

YAN, D. D. et al. Assessment of the phytochemical profiles of novel hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars: A potential route to beer crafting. **Food Chemistry**, v. 275, p. 15–23, 1 mar. 2019.

ZHENG, X. et al. Factors influencing maltotriose utilization during brewery wort fermentations. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 52, 1994.

## APÊNDICE A

Parâmetros utilizados no software MzMine™ (versão 3.0 para Windows, BMC Bioinformatics, Reino Unido) para processamento dos dados cromatográficos:

*Mass detection, mass detector-centroid (noise level,  $5 \times 10^2$ ); ADAP chromatogram builder (min group size in # of scans, 5; group intensity threshold,  $1 \times 10^3$ ; min highest intensity,  $5 \times 10^2$ ; m/z tolerance, 0.5 m/z or 0 ppm); chromatogram deconvolution, algorithm-wavelets (ADAP) (S/N threshold, 10; S/N estimator, intensity window SN; min feature height,  $1 \times 10^3$ ; coefficient/area threshold, 80; peak duration range, 0.02-2.0; RT wavelet range, 0.01-0.20), m/z center calculation – median; hierarchical clustering (min cluster distance (min), 0.01; min cluster size, 3; min cluster intensity,  $1 \times 10^3$ ; min edge-to-height ratio, 0.3; min delta-to-height ratio, 0.2; min sharpness, 100; shape-similarity tolerance, 80; choice of model peak based on, m/z value); alignment, ADAP aligner (GC) (min confidence, 0.01; retention time tolerance, 0.3 min (absolute); m/z tolerance, 0.5 m/z or 0 ppm; score threshold, 0.7 e retention time similarity, retention time difference, 0.4.*

## APÊNDICE B

**Tabela 1.** Identificação dos metabólitos selecionados na análise de variância (ANOVA) através da comparação dos índices de retenção calculados (**IR calc**) com os encontrados na literatura (**IR lit**). O tempo de retenção em minutos (**Tr min**) e a classe química para cada metabólito também estão apresentados.

ID	Identificação	IR calc	IR lit	Tr (min)	Classe
2	acetato de etila	611	610	4.68	Éster
3	isobutanol	622	622	4.81	Álcool
4	3-metilbutanal	650	655	5.14	Aldeído
5	2-metilbutanal	660	661	5.26	Aldeído
9	propanoato de etila	710	712	5.96	Éster
12	isopentanol	731	734	6.45	Álcool
13	2-metil-1-butanol	734	736	6.52	Álcool
17	acetato de isoamila	874	876	10.75	Éster
23	$\beta$ -mirceno	989	990	15.74	Terpeno
24	hexanoato de etila	999	996	16.18	Éster
28	fenilacetaldéido	1047	1051	18.54	Aldeído
32	2-feniletanol	1114	1114	21.83	Álcool
39	octanoato de etila	1196	1195	25.84	Éster
42	acetato de feniletila	1255	1255	28.63	Éster
45	2-undecanona	1293	1290	30.43	Cetona
46	nonanoato de etila	1295	1294	30.53	Éster
49	(Z)-4- decenoato de metila	1308	-	31.09	Éster
51	geranato de metila	1321	1316	31.71	Terpeno
53	9-decenoato de etila	1386	1388	34.59	Éster
54	decanoato de etila	1394	1392	34.98	Éster
56	<i>trans</i> - cariofileno	1421	1423	36.11	Terpeno
57	octanoato de isoamila	1447	1450	37.19	Éster
59	$\alpha$ -humuleno	1457	1454	37.64	Terpeno
64	$\gamma$ -cadineno	1519	1521	40.22	Terpeno
65	dodecanoato de etila	1594	1591	43.21	Éster

IR lit, disponível em <https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>.

Fonte: elaborado pelo autor (2024).