

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Química
Dissertação de Mestrado



***ANÁLISE E TIPIFICAÇÃO DE DIFERENTES AMOSTRAS DE
CERVEJAS ATRAVÉS DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR
IONIZAÇÃO ELECTROSPRAY***

Alexssander Shiguera Araujo
Orientador : Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Campinas, Agosto de 2005.

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA
UNICAMP**

Ar15a Araujo, Alexssander Shigueru.
Análise e tipificação de diferentes amostras de
cervejas através de espectrometria de massas por
ionização *electrospray* / Alexssander Shigueru Araujo. --
Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.

**Dissertação – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.**

**1. *Electrospray*. 2. *Fingerprinting*. 3. Cerveja.
4. Análise de componentes principais. I. Eberlin,
Marcos Nogueira. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Química. III. Título.**

Título em inglês: Analysis and classification of different beers samples by electrospray ionization mass spectrometry

Palavras-chaves em inglês: Electrospray, Fingerprinting, Beer, Principal component analysis

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na Área de Química Orgânica

Banca examinadora: Presidente: Marcos Nogueira Eberlin; Membros: Gilberto Romeiro (UFF-RJ), Ljubica Tassic (IQ-UNICAMP); Suplentes: Fabio Augusto (IQ-UNICAMP), Luis Carlos Dias (IQ-UNICAMP), Luis Alberto de Moraes (USP-Ribeirão Preto)

Data de defesa: 25/08/2005

“Não podemos voltar no tempo e mudar o passado, mas podemos mudar a nós mesmos agora e construirmos um futuro melhor”.

Chico Xavier

DEDICATÓRIA

A minha esposa Fabrisia, que tem compartilhado comigo essa vida, sendo uma pessoa amiga, companheira, amorosa e com certeza, colaborou muito para todas as realizações que já atingi;

A meus familiares, pela convivência e pelos ensinamentos que me foram passados,
acreditando em meu potencial;

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes nos momentos de luta,
comemorações e de vitória.

AGRADECIMENTOS:

- A Deus, por todas as oportunidades de aprendizado que coloca em nossas vidas;
- A minha esposa Fabrisia, por seu amor, companheirismo e auxílio em todos os momentos;
- Aos meus pais Cecílio e Maria, por tudo que me ensinaram e ensinam;
- Ao meu irmão Roberto, por seu incentivo e demonstrações de força de vontade e garra;
- Ao Prof. Marcos, por sua orientação, compreensão e ensinamentos, essenciais para a realização deste trabalho;
- Aos Srs. Sato e Wanderson, pelo apoio dado à realização dos créditos;
- Aos amigos do Laboratório Thomson, pelo companheirismo e ensinamentos;
- Aos amigos do Laboratório Central e da Schincariol, pelo companheirismo e ensinamentos;
- Aos amigos da Cognis pelo companheirismo e convivência;

A Todos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

Formação

- **Graduação**

Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológicas, Instituto de Química da Unicamp (Fev/1996 a Dezembro/1999).

Idiomas

Inglês: fluente.

Japonês: básico.

Histórico Profissional

- **Cognis do Brasil Ltda.** - desde abril/2003

Empresa multinacional do ramo químico

Químico de Desenvolvimento e Aplicação

Atua com pesquisa e desenvolvimento de novos produtos para serem utilizados em diversas áreas de indústrias de base. Desenvolve processos de obtenção de matéria prima de fontes renováveis, atuando nas fases: laboratorial, piloto e escala industrial. Desenvolve produtos onde o foco é obter alto valor agregado, através de inovações tecnológicas (utilização de enzimas por ex.) e que estes produtos tragam sucesso para os clientes. Atende clientes internos desenvolvendo produtos para suas respectivas áreas e clientes externos, auxiliando na aplicação do produto em questão e buscando novas soluções.

- **Primo Schincariol ICR S/A** - de dezembro/2000 a abril/2003

(Empresa de grande porte no segmento bebidas)

Químico Pleno

Elaborou e realizou procedimentos de análises físico-químicas e em Cromatografia Gasosa, Líquida(HPLC), UV/VIS. Implementou métodos de análises em filiais da empresa. Realizou a migração de métodos de análise por via úmida para métodos mais precisos. Elaborou sistemas de relatórios e gráficos estatísticos. Foi Key User do módulo QM no programa R/3 (SAP).

- **Kodak Brasileira Ind e Com Ltda** - de fevereiro/2000 a novembro/2000

(Empresa de grande porte no segmento indústria fotográfica)

Estagiário

Realizou projetos de otimização de processo, criação de cartas de controle, implementou instrumentos de medida inline, treinou operadores; implementou novos softwares corporativos e treinou os analistas no laboratório de controle da qualidade. Troca de experiências e contatos com colaboradores da matriz da empresa.

- **Instituto de Química da Unicamp** - de maio/1997 a julho/1999
(Empresa de médio porte no segmento química)
Aluno de Iniciação Científica
Realizou pesquisas na área de química orgânica - Síntese Orgânica.
Pesquisou novas rotas sintéticas de produtos naturais e análises via Espectroscopias de Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas.
- **Lembongan & Tenisport** - de maio/1993 a dezembro/1995
(Empresa de pequeno porte no segmento vestuário)
Supervisor geral
Contato com bancos, fornecedores, controle financeiro, vendas, treinamento de funcionários, telemarketing, etc.
- **Hirofany Company** - de dezembro/1991 a abril/1993
(Empresa de médio porte no segmento automotivo)
Montador/Operador
Executou rotinas de produção de tapetes para a MAZDA, cliente situada em Hiroshima - Japão.

Participações em Congressos

- VII Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp

Apresentação de Painel
Unicamp, Setembro de 1999

- 8th Brazilian Meeting on Organic Synthesis

Apresentação de Painel
São Pedro - SP, Setembro de 1998

- VI Congresso Interno de Iniciação Científica da Unicamp

Apresentação Oral
Unicamp, Novembro de 1998

Publicações de Artigos

Araujo, A. S.; Rocha, L. L. R.; Tomazela, D. M.; Sawaya, A. C. H. F.; Almeida, R. R.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N., "Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer", *The Analyst*, **2005**, (130) 884-889

RESUMO

ANÁLISE E TIPIFICAÇÃO DE DIFERENTES AMOSTRAS DE CERVEJAS VIA ESPECTROMETRIA DE MASSAS POR IONIZAÇÃO ELECTROSPRAY

AUTOR: ALEXSSANDER SHIGUERU ARAUJO

ORIENTADOR: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

A AQUISIÇÃO DE ESPECTROS DE MASSA POR IONIZAÇÃO ELECTROSPRAY (ESI-MS) DE DIFERENTES TIPOS DE CERVEJA, QUE SÃO AMOSTRAS CONSTITUÍDAS POR UMA MISTURA COMPLEXA DE SUBSTÂNCIAS, É EFETUADA EM POUCOS MINUTOS ATRAVÉS DE SUA INJEÇÃO, COM POUCO PRÉVIO TRATAMENTO. OS ESPECTROS DO TIPO IMPRESSÃO DIGITAL (FINGERPRINTING) PARA CADA TIPO DE CERVEJA POSSIBILITA UMA PRÉVIA SEPARAÇÃO SEGUNDO SUAS CARACTERÍSTICAS PARTICULARES. ATRAVÉS DO TRATAMENTO ESTATÍSTICO (ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS - PCA) DOS DADOS OBTIDOS NOS ESPECTROS ADQUIRIDOS TANTO NO MODO ESI(+)-MS QUANTO NO MODO ESI(-)-MS, POSSIBILITA UMA SEPARAÇÃO DESSAS AMOSTRAS EM CLASSES DISTINTAS DE CERVEJAS. AOS ESPECTROS TÍPICOS DE CADA CLASSE, PODE AINDA SER ACRESCENTADO UMA OUTRA DIMENSÃO ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS ÍONS MAIS CARACTERÍSTICOS, OS ÍONS DIAGNÓSTICOS VIA ESI-MS/MS. A TÉCNICA DE ESI-MS REVELOU UM GRANDE POTENCIAL PARA A ANÁLISE DE DIFERENTES TIPOS DE CERVEJAS PODENDO SER REALIZADA TANTO NA PESQUISA E DESENVOLVIMENTO COMO TAMBÉM NO CONTROLE DE QUALIDADE DURANTE SEU PROCESSO DE FABRICAÇÃO E NO PRODUTO ACABADO, DETECTANDO E IDENTIFICANDO SUBSTÂNCIAS ATRAVÉS DA CARACTERIZAÇÃO VIA ESI-MS/MS.

ABSTRACT

ANALYSIS AND CLASSIFICATION OF DIFFERENT BEER SAMPLES BY ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTROMETRY

AUTHOR: ALEXSSANDER SHIGUERU ARAUJO

ADVISER: PROF. DR. MARCOS NOGUEIRA EBERLIN

THE ACQUIRING OF ELECTROSPRAY IONIZATION MASS SPECTRA OF DIFFERENT KINDS OF BEER, WHICH ARE SAMPLES WITH COMPLEX MIXTURE OF CHEMICAL COMPOSITION, IS DONE IN FEW MINUTES BY THEIR INJECTION, REQUIRING ALMOST NO PRE-TREATMENT. THE FINGERPRINTING SPECTRA OBTAINED FOR EACH KIND OF BEER ALLOWS A PREVIOUS CLASSIFICATION IN RESPECT OF THE PRESENCE OF DIAGNOSTIC IONS. THE USE OF CHEMOMETRIC TOOLS, SUCH AS PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS (PCA), ALLOWS FOR THE SEPARATION OF THE SAMPLES IN DIFFERENT CLASSES OF BEERS. FOR THE SPECTRA OF EACH CLASS, IT CAN BE ADDED A SECOND AND OPTIONAL DIMENSION BY THE ANALYSIS OF THE DIAGNOSTICS IONS, BY MS/MS SPECTROMETRY. THE ESI-MS SHOWED GREAT POTENTIAL FOR THE ANALYSIS OF DIFFERENT BEER SAMPLES, THEREFORE IT CAN ALSO BE USED IN THE RESEARCH AND DEVELOPMENT AS WELL AS IN THE QUALITY CONTROL ANALYSIS DURING THE PRODUCTION PROCESS OR IN THE FINAL PRODUCT, IDENTIFYING AND CHARACTERIZING SUBSTANCES BY MS/MS.

LISTA DE ABREVIATURAS

- $[M - H]^-$ – Representação da molécula ionizada através de desprotonação
- $[M+H]^+$ – Representação da molécula ionizada através de protonação
- APCI – Ionização química à pressão atmosférica (Atmospheric pressure chemical ionization)
- ASBC – Sociedade Americana dos químicos cervejeiros (American Society of Brewing Chemists)
- CG-EM – Cromatografia gasosa/espectrometria de massas
- CI – Ionização Química (Chemical Ionization)
- CID – Dissociação Induzida por Colisão (Collision-induced dissociation)
- CRM - Modelo da carga residual
- d.i. – diâmetro interno
- DIOS – Ionização/dessorção sobre silicone (Desorption/Ionization on silicon)
- EBC – Convenção cervejeira Européia (European Brewery Convention)
- EI – Ionização por Elétrons (Electron Ionization)
- ESI – Ionização por electrospray (Electrospray ionization)
- ESI(-)-MS – Espectrometria de massas por ionização electrospray no modo negativo
- ESI(+)-MS – Espectrometria de massas por ionização electrospray no modo positivo
- ESI-MS – Espectrometria de massas com ionização por electrospray (Electrospray ionization – Mass spectrometry)
- FAB – Bombardeamento rápido de átomos (Fast Atom Bombardment)
- FAN – Amino nitrogênio livre (Free amino nitrogen)
- GABA – ácido- δ -amino butírico
- HCA – Análise hierárquica de clusters (Hierarchical clusters analysis)
- IEM – modelo da evaporação do íon (Ion evaporation model)
- KV – Kilo volt

M/z – Relação massa/carga

MALDI – Ionização por dessorção da matriz assistida por laser (Matrix assisted laser desorption ionization)

MBT – 3-metil-2-buteno-1-tiol

MS – Espectrometria de massas (Mass Spectrometry)

MS/MS – Sistemas conjugados com dois analisadores de massa

NIST – Instituto Nacional de padrões e tecnologia (National Institute of Standards and Technology)

PC – Componente principal

PCA – Análise de componentes principais (Principal component analysis)

PLS – Mínimos quadrados parciais

PRP-1 – Coluna cromatográfica de polímeros poliestireno e divinilbenzeno

Qq – Designação para duplo quadrupolo

RMN-C¹³ – Ressonância magnética nuclear de carbono 13

RMN-H¹ – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (próton)

TOF – Analisador de massas por tempo de voo (Time of flight).

LISTA DE TABELAS

Tabela-1: Divisão dos constituintes da cerveja em várias categorias por tipo químico.....	16
Tabela-2: Especificações Físico-Químicas da Água Cervejeira	17
Tabela-3: Relação das amostras analisadas no estudo.....	33
Tabela-4: Esquema de construção de uma matriz de dados para PCA.....	47
Tabela-5: Porcentagem da variância explicada pelos 10 componentes principais para as amostras analisadas no modo de ESI(+)-MS e ESI(-)MS.	55

LISTA DE FIGURAS

Figura-1: Componentes de um espectrômetro de massas.....	2
Figura-2: Ilustração do processo de ionização por electrospray.	4
Figura-3: Produção da Indústria cervejeira no Brasil nos últimos 10 anos.....	11
Figura-4: Principais açúcares fornecidos pelo malte.	20
Figura-5: Alfa e Beta-ácidos presentes no lúpulo.....	22
Figura-6: Isomerização da Humulona a iso-humulona.	23
Figura-7: Proposta de mecanismo de formação do 3-metil-2-buten-1-ol (MBT) e estruturas dos iso- α -ácidos que não geram o MBT.....	24
Figura-8: Principais polifenóis presentes no lúpulo.	25
Figura-9: Principais óleos, substâncias polares, apolares e ésteres presentes no lúpulo.....	26
Figura-10: Representação do equipamento de ESI-Q-TOF utilizado nas análises.	31
Figura-11: Espectros obtidos no modo ESI(+)-MS: A) cervejas claras tipo P, B) cervejas tipo malzbier, C) cervejas escuras tipo Dark.	35
Figura-12: Espectro MS/MS CID do cátion $m/z=365$, aduto de maltose e sódio...	36
Figura-13: Espectro MS/MS CID do cátion $m/z=381$, aduto de maltose e potássio.	38
Figura-14: Espectro MS/MS CID do cátion $m/z=219$, referente ao aduto de glicose com potássio.	39
Figura-15: Espectro MS/MS CID do cátion $m/z=116$, referente à prolina protonada.	40
Figura-16: Espectro MS/MS CID do cátion $m/z=118$, referente ao ácido-2-amino-3-metilbutanóico protonado.	41
Figura-17: Espectro MS/MS CID do cátion $m/z=104$ referente ao ácido gama amino butírico protonado.....	42

Figura-18: Espectro adquirido no modo ESI(-)-MS, A) cervejas claras tipo P, B) cervejas tipo Malzbier, C) cervejas escuras tipo Dark.	43
figura-19: Espetro MS/MS CID do ânion $m/z=341$ referente à maltose desprotonada.	44
Figura-20: Espectro MS/MS CID do ânion $m/z=665$ referente à maltotetraose desprotonada.	44
Figura-21: Ampliação da figura 18-C.....	45
Figura-22: Espectro MS/MS CID do ânion m/z 377 referente ao aduto de maltose com cloreto.....	46
Figura-23: Gráfico de SCORES-2D obtido dos dados dos espectros adquiridos no modo ESI(+)-MS. PC1=41,6% e PC2 = 27,0%	48
Figura-24: Gráfico de SCORES-3D obtido dos dados dos espectros adquiridos no modo ESI(+)-MS. PC1 = 41,6%, PC2 = 27,0% e PC3 = 8,0%.	49
Figura-25: Gráfico de Score-2D obtido a partir dos dados dos espectros adquiridos no modo ESI(-)-MS. PC1 = 57,2% e PC2 = 17,2%.	50
Figura-26: Gráfico de Score-3D obtido a partir dos dados dos espectros adquiridos no modo ESI(-)-MS. PC1 = 57,2%, PC2 = 17,2% E PC3 = 8,8%.	52
Figura-27: Gráfico de Loadings gerado a partir dos dados dos espectros obtidos no modo ESI(+)-MS.....	53
Figura-28: Gráfico de loadings gerado a partir dos dados dos espectros obtidos no modo ESI(-)-MS.	54

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 – Espectrometria de massas	1
1.2 – Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray - ESI-MS	2
1.2.1 – Dessolvatação das Gotas	4
1.3 – Dissociação Induzida por Colisão (CID)	5
1.4 – Analisador de Massas por Tempo de Vôo (TOF).....	7
1.4 – <i>Fingerprinting</i> de Amostras de Constituição Complexa e Aplicação de Quimiometria nos Dados Obtidos	8
1.4.1 – Quimiometria	9
1.4.1.1 – Análise de Componentes Principais (PCA)	10
1.5 – Cerveja	11
1.5.1 – Tipos de cervejas	13
1.5.2 – Processos de Fabricação de Cerveja.....	15
1.5.3 – A Química da Cerveja	16
1.5.3.1 – Água	16
A cerveja possui em sua composição aproximadamente 90% de água.	16
1.5.3.2 – Malte.....	19
1.5.3.3 – Lúpulo.....	21
1.5.3.4 – Envelhecimento e Deterioração do Aroma e Paladar da Cerveja	27
1.5.3.5 – Análise de Compostos Orgânicos Voláteis em Cervejas.....	28
2 – OBJETIVOS	29
3 – EXPERIMENTAL.....	30
3.1 – Aquisição dos Espectros Fingerprint de Cervejas	30
3.2 – Tratamento Estatístico dos Dados	31
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
4.1 – Espectros de Massas <i>Fingerprint</i> de Cervejas	35
4.1.1 – Espectros no modo ESI(+)-MS.....	36
4.1.2 – Espectros no Modo ESI(-)-MS	42

4.1.3 – Tratamento Estatístico de Dados – Quimiometria	47
5 – CONCLUSÕES	57
6 – BIBLIOGRAFIA	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 – Espectrometria de massas

Segundo John B. Fenn, prêmio Nobel em química no ano 2002 e pioneiro no uso de ionização por electrospray na análise em espectrometria de massas para biomoléculas, a espectrometria de massas é:

“A arte de medir átomos e moléculas para determinar seus pesos moleculares. Esta informação de massa ou peso é às vezes suficiente, freqüentemente necessária e sempre útil na determinação da identidade e estrutura da espécie. Para realizar esta arte, é adicionada carga na amostra (analito) de interesse, então é medida como a trajetória do íon resultante responde, no vácuo, sob várias combinações de campos elétricos e magnéticos. Sendo assim a condição elementar para este método é a transformação de moléculas neutras em íons. A ionização para moléculas de baixo peso molecular é rapidamente efetuada pelo encontro em fase gasosa destas moléculas neutras com elétrons, fótons ou outros íons. Nos últimos anos, os esforços de vários pesquisadores têm sido em produzir íons de espécies de alto peso molecular (>1000 ua) e complexas para serem evaporadas sem que haja sua decomposição”. A espectrometria de massas tem sido descrita como a menor escala do mundo, não pelo tamanho do espectrômetro de massas e sim pelo que ela “pesa”: moléculas. Durante a última década, a Espectrometria de massas passou por grandes avanços tecnológicos permitindo sua aplicação em análises de proteínas, peptídeos, carboidratos, DNA, drogas e várias outras moléculas biológicas relevantes. Devido às fontes de ionização como ionização por electrospray (ESI) e ionização por dessorção da matriz assistida por laser (MALDI), a espectrometria de massas tornou-se uma ferramenta insubstituível, por exemplo, em ciências biológicas. O espectrômetro de massas determina a massa da molécula medindo sua razão massa/carga (m/z). Quatro componentes básicos são, na maioria das vezes, padrão na maioria dos espectrômetros de massas (Figura-1). Após a introdução da amostra, íons são gerados induzindo tanto a perda quanto o ganho de carga elétrica a partir de uma espécie neutra. Uma vez formados, os íons são eletrostaticamente direcionados a

um analisador de massa (“balança molecular”), onde são separados de acordo com a relação m/z e finalmente são detectados¹.

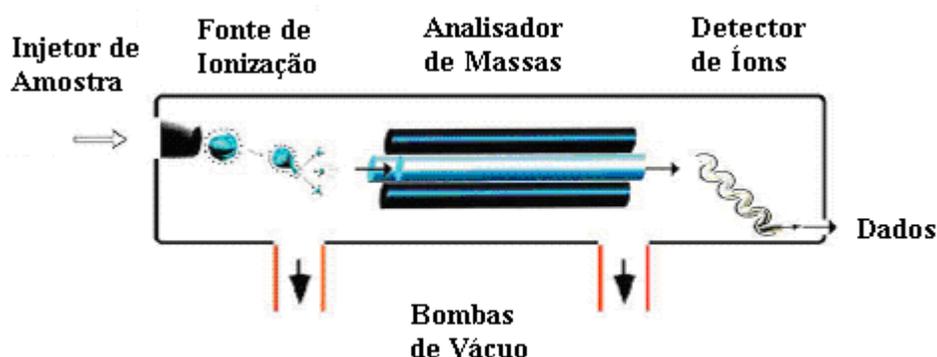


Figura-1: Componentes de um espectrômetro de massas.

Existem diferentes tipos de fontes ionizadoras, tais como: Ionização por Elétrons (EI), Ionização Química (CI), Bombardeamento rápido de átomos (FAB), Ionização por Dessorção da Matriz Assistida por Laser (MALDI), Dessorção/Ionização sobre Silicene (DIOS), Ionização Química à Pressão Atmosférica (APCI) e Ionização por Electrospray (ESI), a qual foi utilizada neste estudo.

1.2 – Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray - ESI-MS

O primeiro experimento utilizando electrospray foi realizado por Chapman, no final da década de 1930 e o primeiro experimento prático envolvendo ionização por electrospray e espectrometria de massas foi concluído por Dole no final da década de 1960. Dole também descobriu o importante fenômeno das múltiplas cargas das moléculas. Entretanto seus experimentos não foram convincentes, pois visavam a análise de espécies poliméricas, como poliestireno, que não estão ionizadas em solução. Em 1984, Yamashita e Fenn demonstraram a aplicabilidade de ionização por electrospray como método de ionização branda².

A técnica de ionização por electrospray tem como princípio, transferir os íons existentes em uma solução para a fase gasosa, de uma maneira branda e suave. Esta versatilidade tem aumentado significativamente a gama de substâncias capazes de serem analisadas, possibilitando, por exemplo, que polipeptídios, que seriam instáveis em condições de análise por EI/CI, possam ser analisados sem que haja sua decomposição. A ionização por electrospray envolve a formação de um spray eletrolítico de uma solução, que gera pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons. A implementação de uma fonte de electrospray é bastante simples se comparado com outras fontes de espectrometria de massas. É necessária uma fonte de alta tensão (1,0 a 7,0 KV) que esteja em contato com a solução contendo eletrólitos. Esta solução é bombeada através de um microcapilar (d.i. 50 a 100 μm) com uma velocidade de fluxo da ordem de 1 a 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ ou menores. No caso de fluxos menores que 1 $\mu\text{L}/\text{min}$, denomina-se nanoelectrospray. Quando um potencial positivo é aplicado na solução, os íons positivos tendem a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletródo. Assim, a gota sendo formada na ponta do capilar estará enriquecida em íons positivos. Conforme a densidade de carga aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra eletródo aumenta provocando uma deformação na gota que está presa na ponta do capilar. A gota ganha forma de um cone, o qual é denominado cone de Taylor. Esta gota na forma de cone permanece “presa” ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial, ocorrendo a liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. A frequência deste processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução.

O electrospray como uma célula eletrolítica

Como foi relatado acima, o electrospray pode gerar espécies eletronicamente. Isto porque este pode ser comparado a uma célula eletrolítica de dois eletrodos. O capilar metálico ou um fio metálico em contato com a solução é um dos eletrodos da célula, o qual pode ser considerado eletródo de trabalho, pois nele ocorrem as principais reações que podem alterar o sistema químico inicial. O segundo

eletrodo é o contra-eletrodo que normalmente está aterrado. Devido ao potencial aplicado e a proximidade destes dois eletrodos, há um alto campo elétrico nesta região que provoca a formação do cone de Taylor. O sistema de electro spray funciona como um tipo especial de célula eletrolítica. Especial porque o transporte de íons não ocorre ininterruptamente pela solução como nas células convencionais, parte do transporte ocorre na fase gasosa.

1.2.1 – Dessolvatação das Gotas

Depois da liberação das gotas com alta densidade de carga do cone de Taylor, estas passam pela região entre a ponta do capilar e o contra eletrodo e vão sofrendo dessolvatação. A massa do solvente é reduzida por evaporação, sendo que para auxiliar este processo, há um fluxo de gás inerte secante, normalmente o nitrogênio e a temperatura da câmara, de 30°C a 100°C. Conforme a gota perde solvente, a densidade de carga aumenta até um ponto em que esta vence a tensão superficial e gotículas são liberadas. Este processo também é conhecido como explosões de Coulomb ou Coulômbicas e está ilustrado na Figura-2.

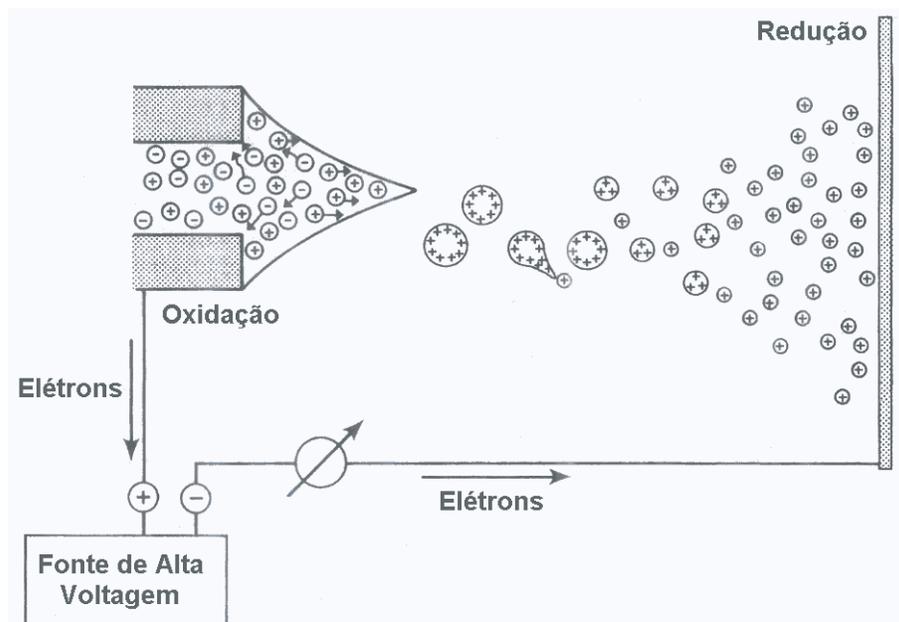


Figura-2: Ilustração do processo de ionização por electro spray.

A carga máxima Q que uma gota de raio R pode manter antes de se fragmentar em gotas menores é fornecida pela Equação-1

$$Q = 8\pi(\varepsilon_0\gamma R^3)^{1/2} \quad (1)$$

Onde ε_0 é a permissividade no espaço e γ é a tensão superficial da gota. Esta dedução foi proposta por Lorde Rayleigh e é conhecida como limite de Rayleigh.

O processo de dessolvatação vem sendo estudado por vários grupos, por exemplo, Tang³ e colaboradores observaram que as gotas, para sofrerem ruptura, não precisam necessariamente alcançar o limite de Rayleigh. A ruptura ocorre em torno de 80% do limite e resulta na expulsão de gotas descendentes com 2 a 3% da massa e 10 a 18% da carga da gota ascendente, sendo assim, as gotas descendentes são bem menores e possuem uma razão massa/carga muito maior.

Existem dois modelos de mecanismos que propõem como os íons finalmente são transferidos para a fase gasosa. Um deles foi proposto por Dole em 1968, denominado CRM ou modelo da carga residual, o qual depende da formação de gotas carregadas extremamente pequenas, $R \cong 1\text{nm}$, geradas a partir de sucessivas explosões de Coulomb, que contenha somente um íon, sendo assim com a evaporação do solvente, restará apenas o íon em fase gasosa. O outro mecanismo proposto por Thomson e Iribarne, modelo da evaporação do íon IEM, sugere que a emissão dos íons ocorre diretamente de gotas muito pequenas e carregadas, onde os íons são expulsos das gotas devido à repulsão eletrostática entre as moléculas de mesma carga¹.

1.3 – Dissociação Induzida por Colisão (CID)

Depois de formado, o íon alcança a região do cone de amostragem que tem um orifício bem pequeno, $1\mu\text{m}$. A partir daí o sistema passa para a região de baixa pressão. Na interface pressão atmosférica/vácuo, há um sistema de bombas e um conjunto de lentes ópticas, que conduzem os íons ao analisador de massas. A região entre o cone de amostragem, chamada de *skimmer* e as lentes hexapolos, é importante, pois é nesta região que pode ocorrer dissociação por colisão

induzida (CID). Estão presentes os íons formados no electrospray e o gás secante (nitrogênio). Há a aplicação de um potencial que gera um campo elétrico e acelera esses íons, promovendo choque físico com o gás secante. Sendo assim, se um íon solvatado entrar nesta região, ele pode sofrer colisão e perder moléculas do solvente. O processo de CID é interessante em estudos de dissociação, porém, pode dificultar a visualização de espécies na forma em que se encontravam na solução. Para minimizar o fenômeno de CID, pode ser controlada a queda de potencial na região do cone de amostragem e o *skimmer*. O processo CID utilizado em sistemas de espectrometria Tandem (MS/MS), desempenha um importante papel na determinação estrutural de íons e análises de misturas complexas. Juntamente com métodos de ionização como bombardeamento rápido de átomos, dessorção a laser e electrospray, que geram íons de moléculas de alto peso molecular, porém com pouca fragmentação em alguns casos devido às condições da molécula apresentarem dificuldade em estabilizar a carga do fragmento formado. A ativação através de colisão desses íons e subsequente dissociação a vários fragmentos fornece informação estrutural a respeito desses íons, necessária para identificação e caracterização.

O processo de dissociação induzida por colisão pode ser considerado por duas etapas: ativação através da colisão, onde uma fração da energia cinética do íon M_1 é transferida para sua energia interna, seguido por dissociação unimolecular do íon excitado internamente. Esse processo está ilustrado nas Equações 2 e 3.



Rafferty e colaboradores⁴, utilizaram a técnica de CID de baixa energia com ionização por electrospray e MALDI para o estudo de polipeptídios com ligação cross-link com sulfonamidas protonadas, podendo comprovar, através das dissociações observadas, a formação da ligação sulfonamida através de processos oxidativos resultantes entre tióis e aminas, que podem estabilizar/modificar a função da proteína. Willians e colaboradores⁵ utilizaram CID

em um sistema de precisão de espectrometria de massas por ionização electrospray e analisador de massas por tempo de voo (ESI-TOF) para o seqüenciamento de misturas de peptídeos. A análise de biomoléculas vem sendo analisada de forma bem sucedida por pesquisadores utilizando sistemas de ionização por electrospray e sistemas Tandem (MS/MS) em espectrometria de massas^{6, 7, 8}, pois este sistema possibilita que polipeptídios, por exemplo, que seriam instáveis em condições de análise por EI/CI, possam ser analisados sem que haja sua decomposição. Espectrometria de massas com ionização por ESI também tem sido aplicada para as análises de identificação e caracterização estrutural de compostos orgânicos, inorgânicos e organometálicos⁹, precursores de nanomateriais¹⁰ e identificação de nanoclusters¹¹.

Uma série de processos eletroquímicos ocorre na ionização por electrospray e a importância desses processos em relação à técnica de ionização, seus avanços trazendo conseqüentemente maior elucidação, foi assunto de discussão envolvendo pesquisadores como de la Mora, Fenn, Cole, Enke, Berkel e Martinez-Sanchez^{12 13}.

1.4 – Analisador de Massas por Tempo de Voo (TOF)

Para um íon que é acelerado através de uma voltagem V , a velocidade resultante v é correspondente à relação massa/carga (m/z). Nos espectrômetros de massas com analisadores por tempo de voo, os íons são separados de acordo com suas velocidades e a razão massa/carga é determinada através da medida de tempo levada para atravessar um caminho (L) de voo até o detector. Estas variáveis estão correlacionadas na Equação-4

$$m/z = 2eEs(t/L)^2 \quad (4)$$

onde E =pulso potencial de extração, s = comprimento do tubo por onde E é aplicado, t = tempo de voo medido para o íon. Desta maneira, todos íons recebem a mesma energia cinética inicial pelo pulso de extração (E) e então percorrem o trajeto da seção de voo (L) onde são separados de acordo com sua relação m/z ,

sendo que os íons mais leves levam menos tempo para atravessar essa seção de voo.

Uma vantagem importante nos analisadores TOF é sua alta sensibilidade, resultado de duas características instrumentais: alta transmissão – devido à ausência de fendas definidoras de raios – separação de íons temporal, que, ao contrário da separação espacial, não direciona íon algum para fora do detector. Em função dos avanços nos dispositivos de gravação de dados, é possível adquirir dados dos espectros analisados referentes a toda a faixa de massa analisada. A resolução nos analisadores de massas TOF pode ser aumentada através da utilização de *reflectrons*, (ou espelho de íons). O *reflectron* tem a função de compensar pela diferença nos tempos de vôos de íons com diferentes valores de energia cinética. Após atravessarem o tubo, os íons penetram por um campo de retardamento, definido por uma série de grades, então são retornados para o tubo. O princípio do *reflectron* é que íons com maior energia cinética irão penetrar esse campo de retardamento, mais profundamente, conseqüentemente, levarão mais tempo para retornar pelo tubo, emparelhando no retorno, com um íon mais lento (mesma massa) no momento em que ambos alcançarem o detector. O *reflectron* impacta na perda de sinal, em parte, devido à introdução de grades adicionais, sendo assim, *reflectrons* sem grades estão sendo confeccionados¹⁴.

1.4 – *Fingerprinting* de Amostras de Constituição Complexa e Aplicação de Quimiometria nos Dados Obtidos

Com a facilidade da técnica de Espectrometria de massas com ionização por electrospray em fornecer espectros de massas de substâncias de constituição complexa, em pouco tempo (alguns minutos), em ampla faixa de relação m/z , onde cada espectro obtido possui características próprias, tem proporcionado que esta técnica seja utilizada, para a obtenção de espectros de *fingerprint*.

A utilização de sistemas de espectrometria de massas com ionização por electrospray foi realizada para a obtenção de espectros *fingerprint* de espécies

moleculares de triacilglicerídeos extraídos de lipídeos¹⁵, análise de caracterização de 52 substâncias sintéticas e aplicação de Análise de Componentes Principais para verificação da similaridade/diversidade entre as substâncias, utilizadas em indústria farmacêutica¹⁶, análise de amostras de extratos alcoólicos de própolis de diferentes regiões, fornecendo espectros com a presença de íons diagnósticos para cada amostra¹⁷, análise de subprodutos oriundos do tratamento de cloração em águas potáveis¹⁸, comprovação de origem e autenticidade de amostras de uísque, podendo rapidamente comprovar se uma amostra de uísque é falsa ou não¹⁹ e na análise de diferentes amostras de cervejas podendo separá-las em classes distintas, identificação e caracterização de íons diagnósticos através da análise por MS/MS adicionando mais uma dimensão aos espectros *fingerprint* obtidos²⁰. Nesses trabalhos relatados sobre obtenção de espectros *fingerprint*, foi utilizado quimiometria para maximizar e obter maiores informações a respeito das amostras analisadas. A utilização de ferramentas estatísticas, como a Análise de Componentes Principais (PCA), Análise Hierárquica de Clusters (HCA), Projeção em Estruturas Latentes (PLS), entre outras, podem fornecer visualização gráfica, confirmação matemática e identificação dos parâmetros (variáveis) mais relevantes em cada situação.

1.4.1 – Quimiometria

Segundo Kowalski²¹, Quimiometria é a aplicação de métodos matemáticos, estatísticos, gráficos ou simbólicos para maximizar a informação química que pode ser extraída de um conjunto de dados. A quimiometria é uma área que se refere à aplicação de métodos estatísticos e matemáticos, assim como aqueles baseados em lógica matemática, a problemas de origem química. A pesquisa cresce aliada ao desenvolvimento de novos equipamentos, os quais juntamente com computadores de grande capacidade de processamento, fornecem uma quantidade muito grande de dados, informações características a respeito de um determinado produto ou amostra, com isso tornam-se necessários tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de relacionar os sinais obtidos (intensidades por exemplo) com os resultados

desejados (concentrações). A quimiometria pode ser útil a qualquer ponto em uma análise. Muitas análises quantitativas que eram realizadas na maioria das vezes por “via úmida” como titulação, precipitação e reações específicas, que são demoradas e muitas vezes pouco precisas, estão cada vez mais sendo substituídas por técnicas instrumentais como: Ressonância Magnética Nuclear, Espectroscopia no Infravermelho, Espectroscopia no visível/ultravioleta, Espectroscopia de Massas, Cromatografia, Polarografia, Análise por Injeção em Fluxo, etc., que aliam a velocidade de análise com uma boa qualidade de resultados. Nessas técnicas instrumentais não é obtida uma informação direta do resultado, mas sim uma grande quantidade de sinais (curvas, picos) que podem ser tratados para uma possível quantificação das várias espécies presentes. A utilização de quimiometria tem sido descrita como aplicação em diferentes áreas como: Análises ambientais²², Farmacêutica²³ e Industrial^{24 25 26} entre outras.

1.4.1.1 – Análise de Componentes Principais (PCA)

A base fundamental da maioria dos métodos modernos para tratamento de dados multivariados é o PCA (*Principal Component Analysis*), que consiste numa manipulação da matriz de dados com objetivo de representar as variações presentes em muitas variáveis, através de um número menor de “fatores”. Constrói-se um novo sistema de eixos (denominados rotineiramente de fatores, componentes principais, variáveis latentes ou ainda autovetores) para representar as amostras, no qual a natureza multivariada dos dados pode ser visualizada em poucas dimensões, é um método de transformar dados complexos para as informações mais importantes e relevantes se tornem mais óbvias. As componentes principais resultam da combinação linear das variáveis originais, são ortogonais entre si, o que significa completamente não correlacionadas e são construídas em ordem decrescente de variância que descrevem²⁷. O crescente número de estudos que lançam mão da quimiometria para tratamento de seus dados se deve à característica multivariada de determinados produtos, em outras palavras, somente um fator, não é suficiente para avaliar o comportamento do mesmo. Vários pesquisadores estão unindo a quimiometria com os dados obtidos

em suas análises, como, por exemplo, da utilização de PCA para a classificação de 64 substâncias halogenadas em função do estudo do efeito de deslocamento químico de RMN-C¹³ no C- α -substituído e no carbono funcional, bem como a elucidação do efeito não aditivo da presença de um halogênio para o deslocamento químico do carbono funcional²⁸.

1.5 – Cerveja

Segundo dados de produção da indústria cervejeira mundial em 2004, o Brasil só perde, em volume, para a China (27 bilhões de litros/ano), Estados Unidos (23,6 bilhões de litros/ano), Alemanha (10,5 bilhões de litros/ano) e Rússia (9 bilhões de litros/ano). O consumo desta bebida, aqui no Brasil, em 2004, apresentou crescimento em relação ao ano anterior, totalizando 8,5 bilhões de litros (Figura-3). O consumo anual percapita é de 46 litros. Os países com maior consumo desta bebida são a República Tcheca, Alemanha e Inglaterra com o consumo percapita anual de 162, 140 e 103 litros respectivamente. O faturamento anual da indústria cervejeira no Brasil está na ordem de 20 Bilhões de Reais^{29 30}.



Figura-3: Produção da Indústria cervejeira no Brasil nos últimos 10 anos.

O processo de fabricação é realizado atualmente através de equipamentos de alta tecnologia embora muitos conceitos artesanais ainda são ensinados nos mais renomados cursos de mestres cervejeiros. A utilização de técnicas de análise modernas, eficazes e rápidas para o controle de qualidade, a identificação de melhorias, pontos ótimos de processo, enfim situações que permitam a obtenção de um produto de melhor qualidade, pode fazer grande diferença neste mercado tão competitivo e lucrativo.

A cerveja pode conter mais de 800 substâncias orgânicas presentes em sua constituição. Tais substâncias são provenientes de suas matérias primas e do processo de fabricação³¹.

No Brasil o ministério da agricultura regulamenta esta bebida, através INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 54, DE 5 DE NOVEMBRO DE 2001, DOU de 07/11/2001, onde é aprovado o Regulamento Técnico MERCOSUL de Produtos de Cervejaria, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, estabelecendo definições para os tipos de cervejas de acordo com suas características de matéria prima e conteúdo.

As cervejas são classificadas em:

1 - Quanto ao extrato primitivo ou original (quantidade de substâncias dissolvidas (extrato) do mosto, que deu origem à cerveja e se expressa em porcentagem em peso):

a) Cerveja leve, a que apresentar extrato primitivo igual ou superior a 5% e inferior a 10,5%, em peso;

b) Cerveja comum, a que apresentar extrato primitivo igual ou superior a 10,5% e inferior a 12,5%, em peso;

c) Cerveja extra, a que apresentar extrato primitivo igual ou superior a 12,5% e inferior a 14,0%, em peso;

d) Cerveja forte, a que apresentar extrato primitivo igual ou superior a 14,0%, em peso.

2 - Quanto à cor:

a) Cerveja clara, a que tiver cor correspondente a menos de 20 unidades EBC (European Brewery Convention).

b) Cerveja escura, a que tiver cor correspondente a 20 ou mais unidades EBC.

3 - Quanto ao teor alcoólico em:

a) Cerveja sem álcool, quando seu conteúdo em álcool for menor que 0,5% em volume, não sendo obrigatória a declaração no rótulo do conteúdo alcoólico;

b) Cerveja com álcool, quando seu conteúdo em álcool igual ou superior a 0,5% em volume, devendo obrigatoriamente constar no rótulo o percentual de álcool em volume, sendo:

Cerveja de baixo teor alcoólico: a que tiver mais de 0,5 até 2,0% de álcool

Cerveja de médio teor alcoólico: a que tiver mais de 2 até 4,5% de álcool

Cerveja de alto teor alcoólico: a que tiver mais de 4,5 a 7% de álcool

4 - Quanto à proporção de malte de cevada em:

a) Cerveja puro malte – aquela que possuir 100% de malte de cevada, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares;

b) Cerveja – É a cerveja elaborada a partir de um mosto cujo extrato primitivo contém um mínimo de 55% em peso de cevada malteada.

c) Cerveja com o nome do vegetal predominante – aquela que possuir proporção de malte de cevada maior do que 20% e menor do que 55%, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares.

5 - Quanto à fermentação:

a) De baixa fermentação

b) De alta fermentação³²

1.5.1 – Tipos de cervejas

Existem diferentes categorias de cerveja:

Ale: Cerveja produzida pelo processo de “alta fermentação” (as leveduras se aglomeram e são levadas para o alto, ou topo durante a fermentação com a produção de CO₂), de coloração clara a avermelhada e teor de extrato em geral maior que 12,5%;

Bock: Termo alemão para cerveja forte, possuem alto teor alcoólico e coloração escura que pode ser proveniente da utilização de malte torrado ou adição de corante caramelo (INS 150c);

Draft: É o termo utilizado pelo processo de tirar cerveja de um barril utilizando bomba manual, ou pressurizador com CO₂, (como é retirado o chope do barril), entretanto as cervejas que levam este título, são fabricadas através do processo de baixa fermentação, e utilização de lúpulo hidrogenado/reduzido, que permite a utilização de garrafas de cor clara;

Dunkel: “Escuro” em alemão, cervejas que utilizam malte torrado e/ou adição de caramelo, podendo ser fabricadas tanto pelo processo de baixa quanto de alta fermentação;

Ice: A cerveja ice nasceu em 1993 no Canadá, é fabricada por meio do "ice process", depois de fermentada, sofre um resfriamento a temperaturas abaixo de zero, quando a água se transforma em finos cristais de gelo, no estágio seguinte, esses cristais são retirados e o que permanece é uma cerveja mais forte;

Lager: Produzidas pelo processo de “baixa fermentação” (as leveduras formam flocos que permanecem na parte de baixo do tanque fermentador);

Lambic: Também conhecidas como *fruit beer*, são feitas com frutas, passam por um processo de fermentação espontânea em barris, já com as frutas;

Malzbier: Cerveja de coloração escura, originada na Alemanha, produzida pelo processo de baixa fermentação, característica pelo sabor adocicado pela adição de caramelo e sacarose;

Pale: Cervejas de coloração clara, do amarelo passando pelo bronze ao cobre.

Pilsen: Cervejas claras, as mais consumidas no mercado brasileiro, de médio teor alcoólico, sabor amargo pronunciado;

Porter: De origem inglesa, coloração escura, cujo sabor amargo vem também da utilização de cevada não-malteada torrada;

Stout: Cerveja de coloração quase negra, sabor tostado e seco, com pronunciado sabor amargo, são produzidas por alta fermentação;

Weissbier (cerveja de trigo): São produzidas pelo processo de alta fermentação, com maturação secundária em barris^{33, 34}.

1.5.2 – Processos de Fabricação de Cerveja

Na Europa, o processo de fabricação de cervejas, segue os padrões estabelecidos pela Comunidade Européia baseados na Lei de Pureza da Baviera, (“Reinheitsgebot”) estabelecida na Alemanha em 1516, na qual limita os fabricantes a apenas utilizarem para a fabricação de cervejas, Água, Malte, Lúpulo e a Levedura para fazer a fermentação. Em outros países, são utilizados diferentes tipos de fontes de açúcares vindos do arroz e do milho (chamados de adjuntos do malte), mistura de açúcares comercializada especialmente para este processo (alta maltose), enzimas, co-enzimas e outros aditivos a fim de diminuir os custos de fabricação da cerveja. Esses açúcares são necessários, pois após passarem pelo metabolismo das leveduras, são transformados em álcoois e em outros compostos orgânicos responsáveis pelo aroma e sabor da cerveja. No Brasil, quando uma cerveja é produzida sem a utilização dos adjuntos do malte, ela é considerada puro malte, sendo que toda fonte de açúcares, enzimas e co-enzimas virão do próprio malte, fornecendo um produto de maior custo. O lúpulo é responsável pelo sabor amargo da cerveja, conferido através dos α -ácidos. Além dos diferentes tipos de processo de fabricação, a composição mineral da água utilizada é relevante em todo o processo de fabricação da cerveja. A quantidade de cálcio e magnésio, responsáveis pela dureza da água, pH, alcalinidade, entre outros, podem ser tratados se a água na fonte não possui os atributos ideais para o processo, no qual uma faixa de concentração para cada substância é considerada desejável na fabricação da cerveja³¹.

Tabela-1: Divisão dos constituintes da cerveja em várias categorias por tipo químico

Substância	Concentração	Número de compostos	Fonte
Água	90-94%	1	-
Álcool etílico	2,5-5,0%	1	Levedura, malte
Dióxido de Carbono	2,1-2,9v/v	1	Levedura, malte
Outros álcoois	0,1-0,3%	15	Levedura, malte
Carboidratos	1,0-5,0%	±100	Malte, adjunto
Sais Inorgânicos	0,5-0,8%	26	Água, Malte
Compostos Nitrogenados	0,26-0,45%	±100	Levedura, malte
Ácidos Orgânicos	0,17-0,22%	±200	Levedura, malte
Aldeídos	30-40 mgL ⁻¹	±50	Levedura, lúpulo
Ésteres, Cetonas	0,03-0,06%	±150	Levedura, malte
Compostos Sulfurados	2,0-3,0 mgL ⁻¹	41	Levedura, malte
Derivados do Lúpulo α-Ácidos β-Ácidos	30-60 mgL ⁻¹	>100	Lúpulos
Compostos de Vitamina B	5,0-11,0 mgL ⁻¹	13	Levedura, malte

1.5.3 – A Química da Cerveja

1.5.3.1 – Água

A cerveja possui em sua composição aproximadamente 90% de água.

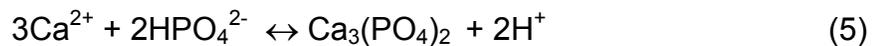
A composição da água em seus reservatórios naturais, depende da natureza mineral de sua região. Em áreas onde as rochas são mais rígidas, a água não penetra profundamente e neste caso não será “dura”, ou seja, baixa concentração de sais dissolvidos. Por outro lado, em regiões que as rochas são mais permeáveis, como por exemplo, formações rochosas do tipo gipsita, a água penetra profundamente e dissolve vários minerais rumo aos reservatórios. Quando

a água possui concentração alta de cálcio e/ou magnésio dissolvido, ($> 150 \text{ mg/L CaCO}_3$) é chamada de “água dura”. Uma composição desejada de água para a fabricação de cerveja encontra-se na Tabela-2.³¹

Tabela-2: Especificações Físico-Químicas da Água Cervejeira

PARÂMETRO	UNIDADE	ESPECIFICAÇÃO
Aparência	-	Límpida e clara
Sabor	-	Insípida
Odor	-	Inodora
pH	pH	6,5 – 8,0
Cor	(mg Pt/L)	0 - 5
Turbidez	NTU	menor que 0,4
Matéria orgânica	(mg O ₂ cons./L)	0 - 0,8
Sólidos dissolvidos totais	(mg/l)	50 - 150
Dureza total	(mg CaCO ₃ /L)	18,0 - 79,0
Dureza temporária	(mg CaCO ₃ /L)	18,0 - 25,0
Dureza permanente	(mg CaCO ₃ /L)	0 - 54,0
Alcalinidade	(mg CaCO ₃ /L)	0,8 - 25,0
Sulfatos	(mg SO ₄ /L)	1 - 30
Cloretos	(mg Cl/L)	1 - 20
Nitratos	(mg NO ₃ /L)	ausência
Nitritos	(mg NO ₂ /L)	ausência
Sílica	(mg SiO ₂ /L)	1 - 15
Cálcio	(mg Ca ²⁺ /L)	5 - 22,0
Magnésio	(mg Mg ²⁺ /L)	1 - 6
Ferro	(mg Fe/L)	ausência
Alumínio	(mg Al/L)	máx. 0,05
Amoníaco	(mg N/L)	ausência
CO2 livre	(mg CO ₂ /L)	0,5 - 5

Dentre os íons necessários para o processo de fabricação da cerveja, o íon Cálcio desempenha um importante papel em diferentes etapas como, por exemplo, no efeito acidificante que ele tem na mosturação. O mosto, que é a solução em água potável de carboidratos, proteínas, sais minerais e outros compostos, resultantes da degradação enzimática do malte, com ou sem adjuntos cervejeiros, realizada mediante processos tecnológicos adequados, possui alta concentração de fosfato derivado do malte, produzindo um efeito tampão e elevando o pH. Os íons Cálcio formam o precipitado fosfato de cálcio liberando íons H^+ na solução (Equação-5).



O pH mais baixo favorece a enzima β -amilase, a qual possui pH ótimo ao redor de 4,7. Um mosto produzido através de água ausente de cálcio possui pH entre 5,8 e 6,0 enquanto que um mosto produzido através de água tratada com cálcio possui pH entre 5,3 e 5,5. Esta enzima promove a quebra do amido em maltose, tornando o mosto mais fermentável. Proteínas presentes no mosto formam precipitados com cálcio e liberam íons H^+ em solução favorecendo um pH mais ácido que é propício para enzimas do tipo protease (presentes no malte e que possuem pH ótimo na faixa de 4,5 a 5,0) realizem a conversão de proteínas em estruturas menores denominadas de Amino Nitrogênio Livre (FAN). Os compostos de Amino Nitrogênio Livre são utilizados pelas leveduras durante a fermentação para a produção de aminoácidos, sendo assim o aumento do nível de FAN no Mosto proporciona melhores condições para as leveduras durante a fermentação. Por outro lado, o excesso de proteínas é indesejável, dificultando as etapas de filtração e as proteínas de alto peso molecular também são susceptíveis a formação de turbidez na cerveja, diminuindo também o tempo de prateleira. Outros papéis desempenhados pelo Cálcio são a precipitação de oxalato de cálcio, melhora da viscosidade para a filtração e outros processos que são favorecidos por um pH mais ácido. O íon Magnésio também pode disputar pelas reações de precipitação com fosfato, porém produzindo um sal mais solúvel. Este íon é importante para as leveduras, pois desempenha um papel de co-fator na

produção de algumas enzimas durante a fermentação, assim como os íons Potássio. Os íons sulfato e cloreto possuem uma correlação, pois são usados na razão de 2:1 respectivamente. O sulfato é importante para a produção dos aminoácidos cisteína e metionina. Algumas cepas de leveduras excretam sulfetos que podem ser reduzidos a dióxido de enxofre e sulfeto de hidrogênio que possuem odor mesmo a concentrações de ppb. A presença de bactérias também pode causar a produção de várias substâncias derivadas de enxofre. Conforme descrito anteriormente, a concentração de sais depende das características minerais da região de origem da água, entretanto se a composição mineral não a desejável, é realizado um tratamento para que sejam atingidas as condições ideais para o preparo da cerveja, como por exemplo, adição de cloreto de cálcio nos casos de níveis baixos deste íon ou tratamento por resinas de troca-iônica quando há excesso do mesmo. ^{31, 35}.

1.5.3.2 – Malte

O malte utilizado na indústria cervejeira é obtido a partir de cevadas de variedades selecionadas especificamente para essa finalidade. A cevada é uma planta da família das gramíneas – parente próximo do trigo – e sua cultura é efetuada em climas temperados. No Brasil, é produzida em algumas partes do Rio Grande do Sul durante o inverno; na América do Sul, a Argentina é grande produtora.

Após a colheita da safra no campo, os grãos (sementes) de cevada são armazenados em silos, sob condições controladas de temperatura e umidade, aguardando o envio para a maltaria – indústria que faz a transformação da cevada em malte. Este processo consiste, basicamente, em colocar o grão de cevada em condições favoráveis à germinação, deixar que ela ocorra, e interrompê-la tão logo o grão tenha iniciado o processo de criação de uma nova planta. Nessa fase, o amido do grão apresenta-se em cadeias menores que na cevada, o que o torna menos duro e mais solúvel, e, no interior do grão, formam-se enzimas que são fundamentais para o processo de fabricação de cerveja. A germinação é então interrompida por secagem a temperaturas controladas, de modo a reduzir o teor de umidade sem destruir as enzimas formadas.

Malte, portanto, é o grão de cevada que foi submetido a um processo de germinação controlada para desenvolver enzimas e modificar o amido, tornando-o mais macio e solúvel. Utiliza-se, nesse processo, estritamente, as forças da natureza, que proveu as sementes da capacidade de germinar para desenvolver uma nova planta. Tudo o que o homem faz nesse processo é controlar as condições de temperatura, umidade e aeração do grão.

O malte é o fornecedor dos açúcares, entre outras substâncias, necessários para o processo de fermentação. A concentração dos maltooligossacarídeos influencia o metabolismo das leveduras e conseqüentemente algumas características da cerveja, pois várias substâncias orgânicas voláteis são metabólitos produzidos durante a fermentação/maturação. A Figura-4 ilustra os principais açúcares encontrados nos Malte.

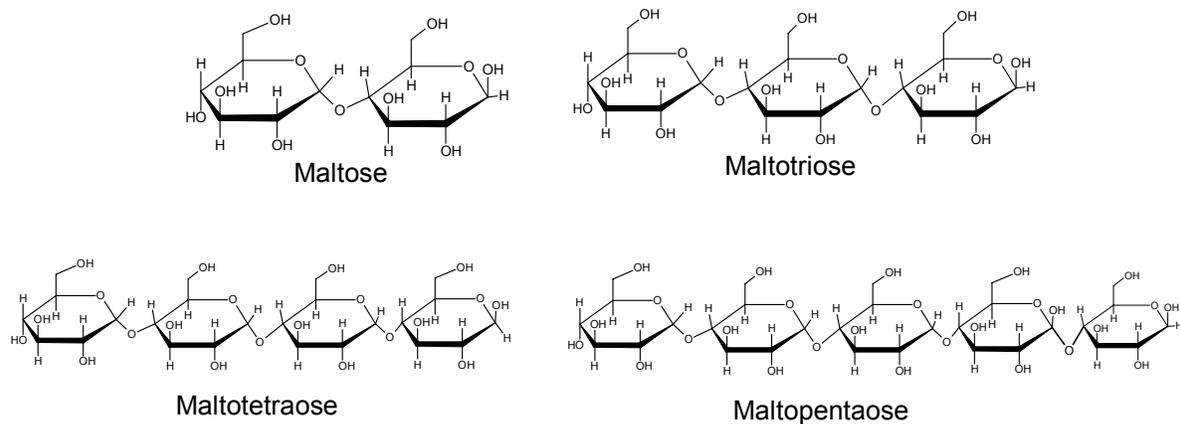


Figura-4: Principais açúcares fornecidos pelo malte.

Outros carboidratos presentes no malte são os β -Glucanos. Sua alta concentração é indesejável, pois aumenta a viscosidade durante o processo de fabricação do mosto, dificultando e podendo provocar turbidez na cerveja devido à sua baixa solubilidade. A concentração de β -Glucanos deve ser diminuída durante o processo de malteamento, através da enzima β -Glucanase presente na cevada ou através da adição de enzimas para realizarem hidrólise, sem que haja prejuízo com a modificação das proteínas presentes³⁶.

1.5.3.3 – Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma trepadeira perene, cujas flores fêmeas apresentam grande quantidade de resinas amargas e óleos essenciais, os quais conferem à cerveja o sabor amargo e o aroma que caracterizam a bebida. A quantidade e a espécie (variedade) de lúpulo utilizado são características para cada tipo de cerveja.

Trata-se de uma cultura dos climas frios do hemisfério norte, sendo os países do norte europeu e os Estados Unidos os grandes produtores. No Brasil não existem condições climáticas adequadas à produção de lúpulo. As substâncias responsáveis pelo sabor amargo são os ácidos do lúpulo, α -ácido (humulona) e β -ácido (lupulona). Além desta característica, possuem atividade bacteriostática, inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas. Esta característica é atribuída ao grupo prenil, presente em suas moléculas, agindo na membrana plasmática celular dessas bactérias. A diferença entre as estruturas da humulona e lupulona está no fato de que esta última possui um grupo prenil a mais e cada uma possui três constituintes que diferem na natureza da cadeia carbônica lateral, as quais são derivadas dos aminoácidos, leucina, valina e iso-leucina, dando origem à humulona, cohumulona, adhumulona e a lupulona, colupulona e adlupulona respectivamente, conforme ilustrado na Figura-5.

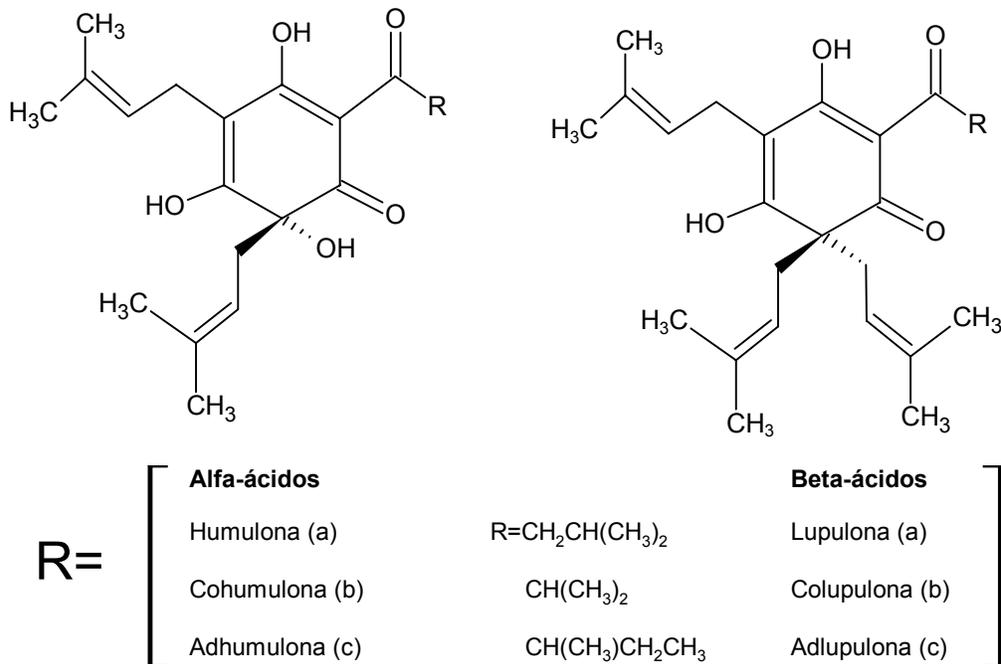


Figura-5: Alfa e Beta-ácidos presentes no lúpulo.

Durante a fervura do mosto (Mosturação) ocorre a volatilização e oxidação de diversas substâncias oriundas do lúpulo, porém uma das reações mais importante é a isomerização térmica dos α -ácidos (humulona), formando os iso- α -ácidos (iso-humulonas), através de uma contração de anel do tipo aciloin. Cada humulona gera duas iso-humulonas (Figura-6): a *cis*-iso-humulona e a *trans*-iso-humulona, dependendo do arranjo espacial do álcool 3^{ário} no carbono C(4) e cadeia lateral prenil no carbono C(5). A razão *cis/trans* depende das condições de fervura do mosto, em geral é 70:30. A isomerização pode ser favorecida pelo pH alto e adição de Cálcio e Magnésio. O processo de isomerização está ilustrado na Figura-6.

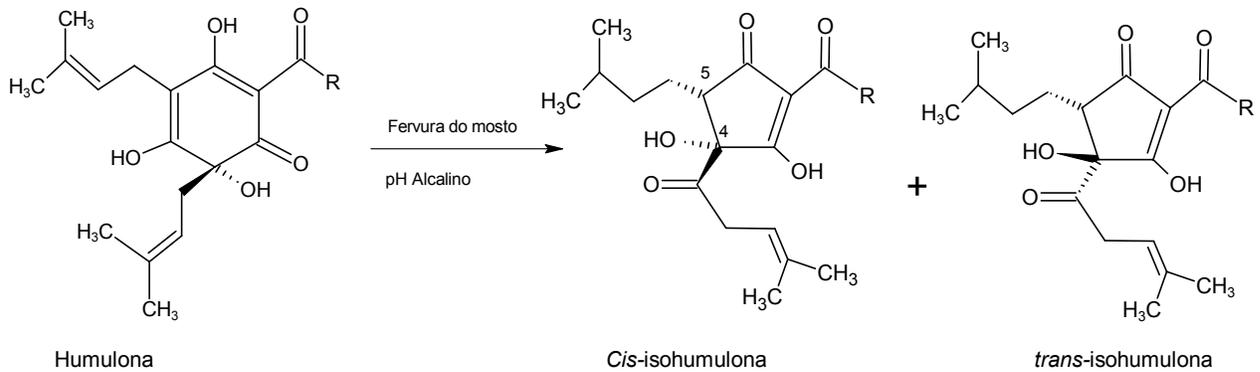


Figura-6: Isomerização da Humulona a iso-humulona.

Os iso- α -ácidos são responsáveis pelo amargor e sua concentração em ppm, é um parâmetro de controle da cerveja, medido em unidades de amargor (UA-ppm). Os produtores de cerveja utilizam o lúpulo em pellets (pequenas quantidades prensadas na forma de pastilhas) ou podem utilizar extratos de lúpulo que possuem maior concentração dos ácidos do lúpulo, isomerizados, podendo ser utilizados em etapas seguintes à fervura do mosto.

Além do extrato de lúpulo, os fornecedores dessa matéria prima, possuem uma linha de iso- α -ácidos hidrogenados e/ou reduzidos com borohidreto de sódio, com o objetivo de fornecer estabilidade à luz. Os iso- α -ácidos podem sofrer degradação através da incidência de luz (fótons), sofrendo reações que liberam uma substância que possui aroma desagradável: o 3-metil-2-buteno-1-tiol (MBT), conhecido pelo efeito “*light struck in beer*”. Os compostos hidrogenados não sofrem esse tipo de reação, podendo ser utilizados para potencializar a estabilidade da cerveja e em cervejas que não utilizam garrafas cor âmbar. As reações de formação do MBT e as estruturas dos iso- α -ácidos hidrogenados estão ilustradas na Figura-7.

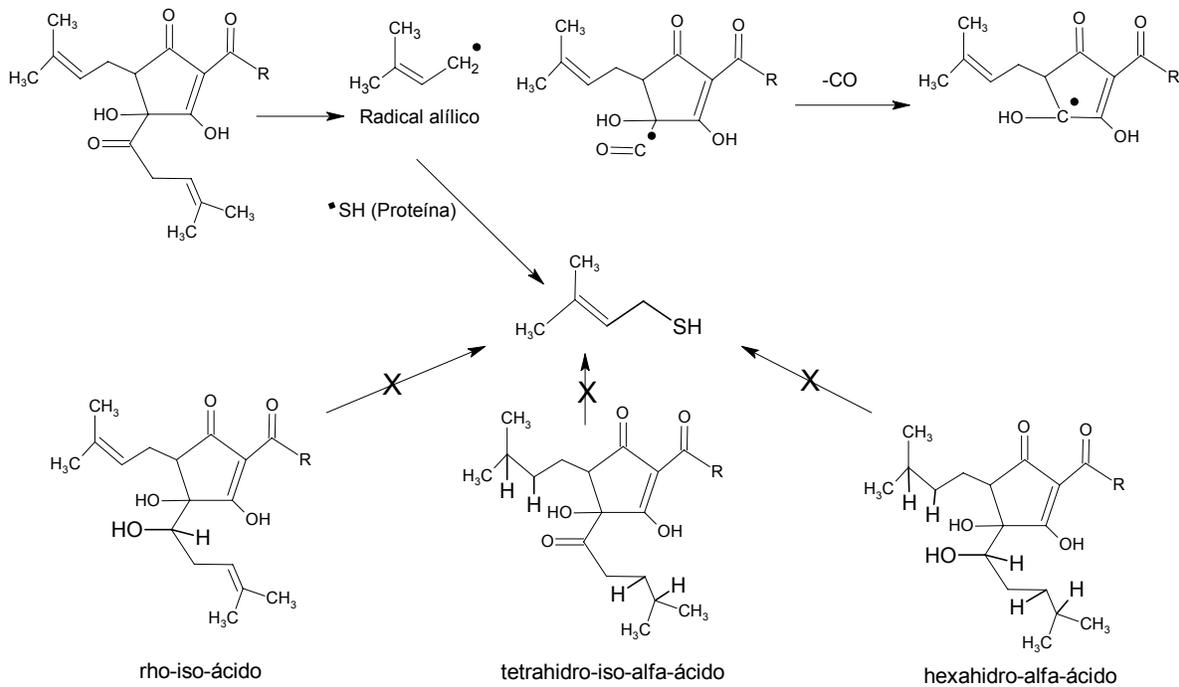


Figura-7: Proposta de mecanismo de formação do 3-metil-2-buteno-1-tiol (MBT) e estruturas dos iso- α -ácidos que não geram o MBT.

1.5.3.3.1 – Polifenóis

Os polifenóis de baixo peso molecular são antioxidantes naturais e contribuem em grande parte no poder redutor durante a mosturação, protegendo a cerveja contra a oxidação e melhorando a estabilidade do sabor. Esta classe de substâncias reage também com proteínas e peptídeos formando complexos insolúveis, contribuindo para a estabilidade contra a turbidez da cerveja e estabilidade da espuma. Os polifenóis encontrados no lúpulo estão ilustrados na Figura-8.

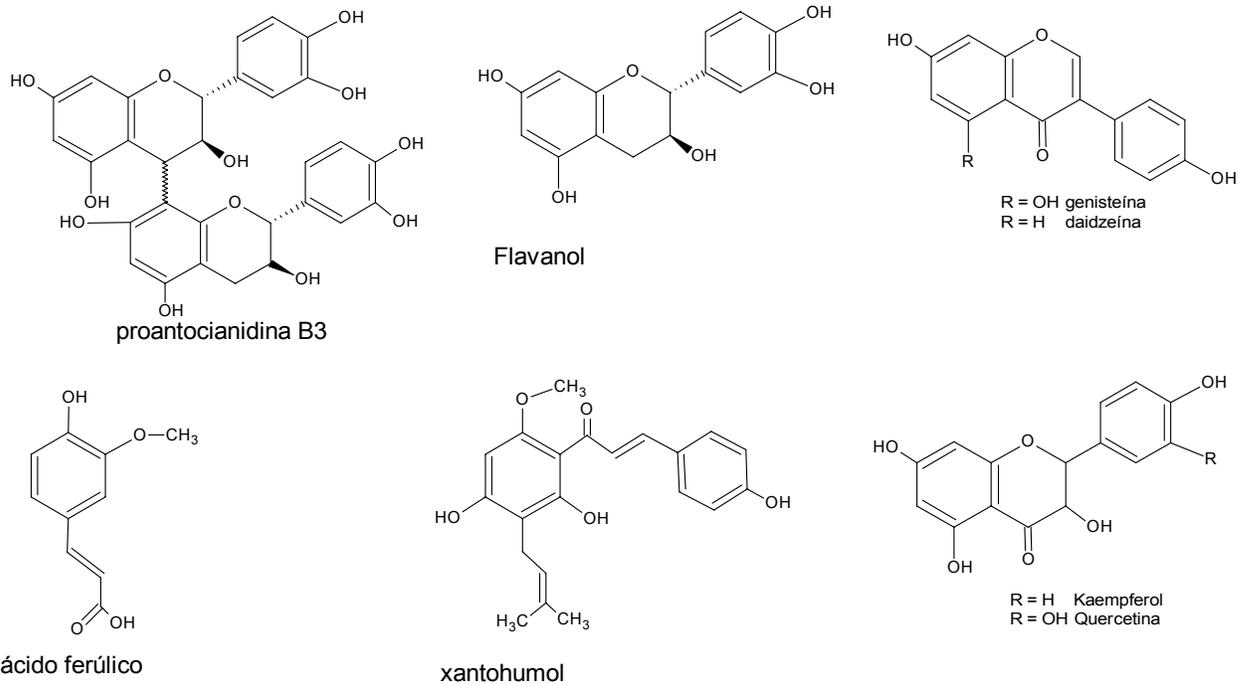


Figura-8: Principais polifenóis presentes no lúpulo.

1.5.3.3.2 – Óleos

Também são encontrados no lúpulo, óleos apolares (terpenos) e polares álcoois, ésteres, sulfetos. Os mais importantes estão ilustrados na Figura-9^{31, 37, 38}.

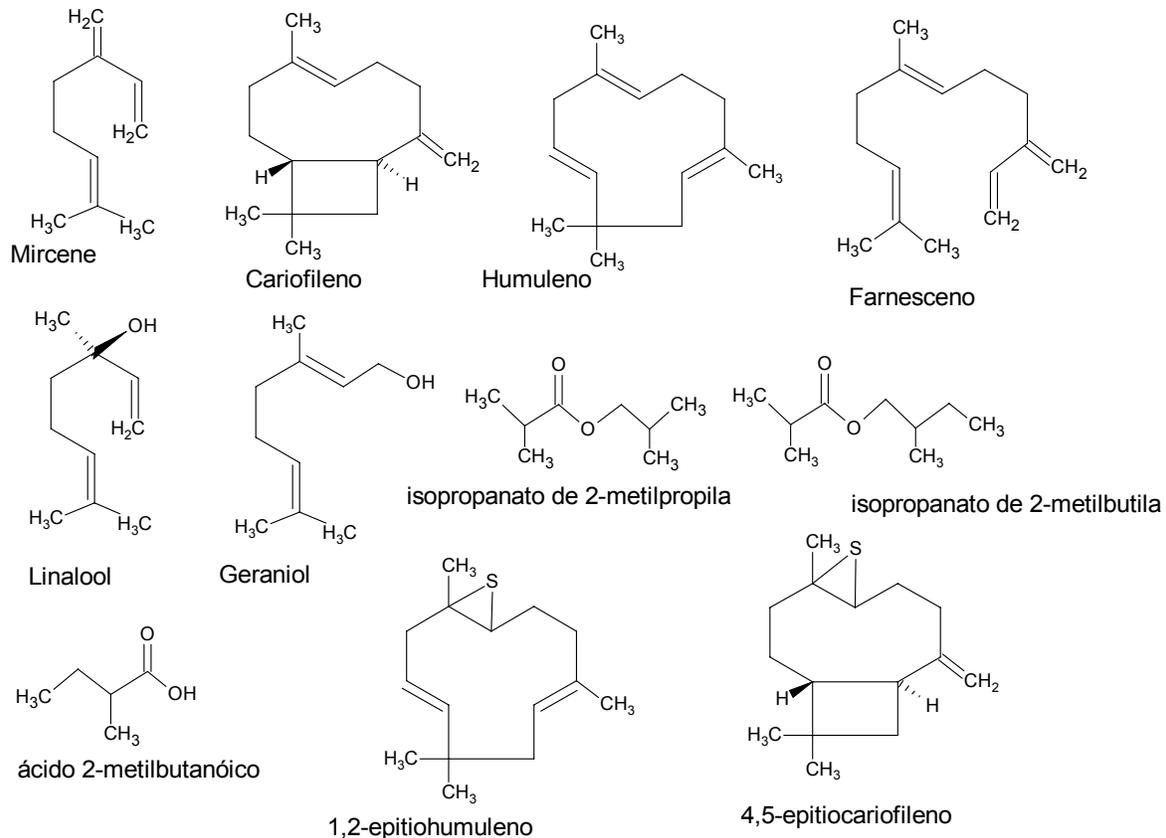


Figura-9: Principais óleos, substâncias polares, apolares e ésteres presentes no lúpulo.

1.5.3.3.3 – Análises de lúpulo

Os métodos analíticos mais utilizados pelas cervejarias são os métodos fornecidos pela ASBC (American Society of Brewing Chemists) e EBC (European Brewing Convention). Para a determinação qualitativa e quantitativa dos ácidos do lúpulo, é utilizada cromatografia gasosa de alta eficiência. Entretanto pesquisadores tem utilizado sistemas híbridos de Cromatografia Gasosa com espectrometria de massas para a determinação tanto dos ácidos do lúpulo como seus outros constituintes.

Hofte e colaboradores³⁹ estudaram a caracterização de ácidos do lúpulo utilizando cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa com ionização por electrospray. Identificaram seis isômeros da humulona e lupulona. A sensibilidade

observada ainda foi baixa devido ao pH alto necessário para a separação dos componentes utilizando uma coluna de polímero PRP-1.

Roberts e colaboradores⁴⁰ utilizaram um sistema de CG-EM para a análise de extrato de lúpulo rico em óleos essenciais. A análise revelou a presença de várias substâncias, as quais foram correlacionadas com os espectros do banco de dados NIST. Compararam as análises realizadas utilizando um equipamento com quadrupolo e outro por tempo de voo (TOF). A análise que utilizou o sistema TOF obteve melhores resultados com picos mais resolvidos no cromatograma.

1.5.3.4 – Envelhecimento e Deterioração do Aroma e Paladar da Cerveja

Durante o armazenamento da cerveja, alguns parâmetros, como altas temperaturas, podem ocasionar o envelhecimento acelerado da bebida, formando as substâncias denominadas *off-flavors*. Essas substâncias são, em grande parte aldeídos formados por processos de oxidação dos compostos presentes na cerveja⁴¹.

Madingan e colaboradores⁴², sabendo que a presença desses aldeídos entre outras substâncias, mesmo em baixa concentração, como o *trans*-2-nonenal, que a 0,11 µg/L já causa sabor de papel na cerveja, buscaram desenvolver um método para a identificação desses compostos, através de Cromatografia Líquida de alta eficiência. Entre os compostos, estão o furfural e o 5-hidroximetil-furfural, os quais são bastante documentadas na literatura de haver correlações de suas concentrações em função da temperatura de estocagem da bebida. Estas substâncias são resultados de reações inter-relacionadas com a reação de Maillard, sendo intermediários produzidos de pentoses e hexoses.

Nyborg e colaboradores⁴³, estudaram o papel do sulfito adicionado como antioxidante na cerveja, porém, formando um aduto com o *trans*-2-nonenal e comparando os espectros de RMN-H¹ obtidos de adutos sintetizados, com os adutos formados sob pH 4,5 e presença de álcool para simular as condições da cerveja. Concluíram que o metabisulfito utilizado, além de atuar como antioxidante, também retarda o envelhecimento da cerveja através da formação do aduto com *trans*-2-nonenal.

Foster e colaboradores⁴⁴, utilizaram métodos de quimiometria (Projeção em estruturas latentes – PLS) a fim de correlacionar a análise de compostos carbonílicos com análise sensorial. Neste trabalho, as substâncias mais influentes no sabor da cerveja envelhecida foram: 2-furfural, acetal, acetato de furfurila e 5-hidroximetil-furfural.

Araki e colaboradores⁴⁵, da cervejaria Japonesa Sapporo, desenvolveram um novo parâmetro para avaliar o envelhecimento em cervejas: a diminuição da forma *trans* das iso-humulonas, confirmado também através da análise sensorial através de um painel de degustadores que avaliaram amostras de um mesmo lote que foram armazenadas sob diferentes temperaturas e condições. As menores relações *trans/cis* obtiveram maior nota para intensidade de degradação na análise sensorial.

1.5.3.5 – Análise de Compostos Orgânicos Voláteis em Cervejas

A presença de determinadas faixas de concentração de álcoois como propanol, iso-butanol, álcool amílico, 2-feniletanol e ésteres como acetatos de etila, iso-amila, fenil etila são importantes para as características de aroma e paladar da cerveja. As concentrações em quantidades fora das especificações podem indicar desvios que ocorreram durante o processo e conseqüentemente um produto de menor qualidade, como no caso do diacetil (2,3-butanodiona e 2,3-pentanodiona) que são produzidos e consumidos durante a fermentação e possuem aroma característico de manteiga. As dicetonas, como também são chamadas, possuem limite de detecção sensorial de 0,10 mg/L sendo que a concentração em cervejas é em geral menor que 0,05mg/L. Algumas cervejas possuem concentração maior como no caso das stouts (0,60 mg/L) e algumas cervejas produzidas em micro-cervejarias (1,0 mg/L). O mecanismo de formação da 2,3-butanodiona está associado a partir da derivação do piruvato, enquanto que a 2,3-pentanodiona deriva do acetohidroxi butirato e o aminoácido competidor é a leucina. A concentração pode chegar até 1,0 mg/L durante a fermentação (3^o dia) e então vai reduzindo nos dias seguintes e durante a maturação, através de enzimas presentes na levedura^{46 47}.

2 – OBJETIVOS

Aplicação da técnica de ESI-MS na aquisição de espectros *fingerprint* de diferentes amostras de cervejas, identificação das substâncias de maior relevância presentes para a caracterização de cada grupo e utilização de quimiometria para a classificação das cervejas em grupos distintos.

3 – EXPERIMENTAL

3.1 – Aquisição dos Espectros Fingerprint de Cervejas

Foram analisadas 29 amostras de diferentes tipos de cerveja, entre elas Ales e Lagers: Pilsens, Drafts, Bocks, Stouts, Dunkels e Malzbiers, através da técnica de ESI-MS nos modos positivo e negativo.

Para as análises de impressão digital foi utilizado um espectrômetro de massas tipo Q-TOF da Micromass (Manchester, RU) trata-se de um equipamento do tipo híbrido constituído de duplo quadrupolo (Qq) e espectrômetro de massas do tipo TOF (analisador de massas por tempo de voo) em arranjo ortogonal (Figura-10). A temperatura da fonte foi de 100°C, a voltagem do capilar utilizada foi de 3.0 KV e do cone foi 40 V. 10 mL de cada amostra foi adicionada a um béquer de 100 mL e degaseificada, para eliminar o CO₂ utilizando um banho de ultra-som durante 5 minutos. Após degaseificação, 250 µL de cada amostra foram adicionados em um frasco completando para 1 mL com uma solução metanol:água 1:1. Para a análise de ESI(+)-MS foi adicionado em cada amostra 2 µL de ácido fórmico e para a análise de ESI(-)-MS foi adicionado 2µL de hidróxido de amônio. As amostras foram injetadas a uma vazão de 15 µL.min⁻¹ utilizando uma seringa automática (Harvard Apparatus). Os espectros de massa foram adquiridos na faixa de massa/carga (m/z) de 50 até 1000. Os reagentes foram adquiridos da Merck e utilizados sem nenhum outro tratamento.

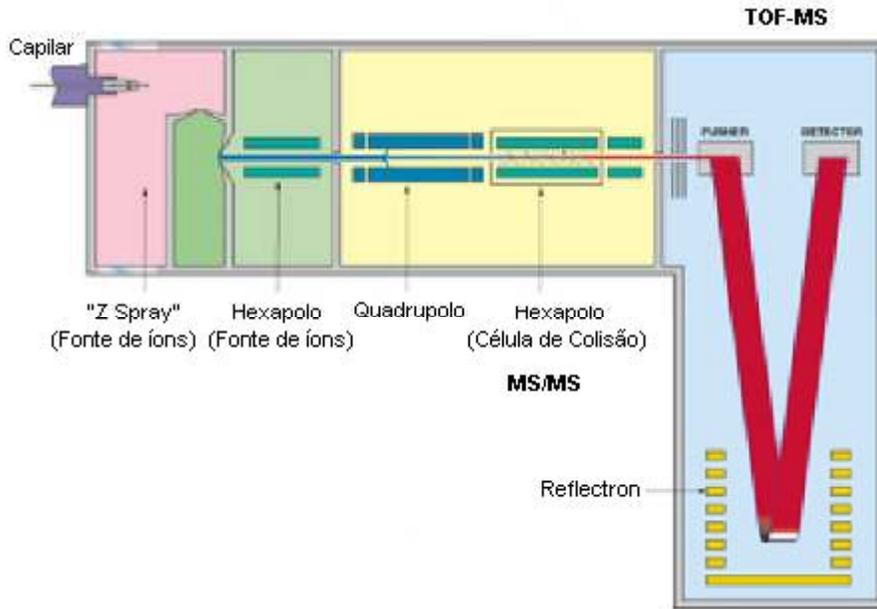


Figura-10: Representação do equipamento de ESI-Q-TOF utilizado nas análises.

3.2 – Tratamento Estatístico dos Dados

Para classificar as amostras de cerveja após a análise de impressão digital pelo ESI-MS foi utilizado Análise de Componentes Principais (PCA). Matrizes de dados foram construídas utilizando os dados dos espectros de massa em ambos os modos ESI(+)-MS e ESI(-)-MS. Para a construção de cada matriz foram considerados os 20 maiores picos de cada um dos 29 espectros obtendo um total de 96 valores de m/z (colunas da matriz – variáveis), pois nem todos os valores de m/z eram comuns entre as amostras ou estavam presentes em menor intensidade. As linhas da matriz foram preenchidas pelas amostras e suas respectivas intensidades referente a cada coluna. Einsight e Pirouette, ambos da infometrix (Seattle, EUA), foram utilizados para realizar o PCA selecionando Centrado na Média como pré-tratamento da matriz de dados.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As vantagens fornecidas pela técnica de Ionização por Electrospray permitem que ela seja utilizada por diferentes áreas, inclusive para análise de cervejas, conforme relatado anteriormente. Entretanto, a aquisição de espectros *fingerprint* para diferentes tipos de cervejas, a classificação das amostras segundo seus íons diagnósticos e estudo de caracterização desses íons mais relevantes ainda não havia sido realizada.

Foram padronizadas, a utilização de 10 mL da amostra em um béquer de 100 mL e tempo de permanência no banho de ultra-som durante 5 minutos a fim de que a perda de substâncias voláteis fosse minimizada. Para a escolha desta padronização, foi observada a reprodutibilidade na aquisição de espectros da mesma amostra envolvendo a quantidade e intensidade de íons. A solução pode conter íons resultantes simplesmente da dissolução, por exemplo, de sais, ou íons formados por protonação ($[M+H]^+$) ou desprotonação ($[M - H]^-$) ou complexação com cátions e ânions de substâncias ácidas ou básicas com ampla faixa de pesos moleculares.

Para a análise de cervejas, a técnica de Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray mostrou-se conveniente para a introdução direta, sem prévia separação cromatográfica, mesmo sendo uma amostra de constituição complexa. Na cerveja, muitas moléculas que possuem sítios ácidos ou básicos serão detectadas como um íon contendo somente uma carga (mono carregado), na sua forma protonada $(M-H)^+$ ou desprotonada $(M-H)^-$.

Foram escolhidas diferentes marcas e variedades de cervejas a fim de obter os espectros *fingerprint* contendo conjuntos de íons diagnósticos característicos a cada tipo de cerveja. Essa variedade na presença de determinados íons pode ser resultado da matéria prima utilizada e do processo de fabricação. As informações sobre a utilização de matéria prima, teor alcoólico e tipo de cerveja estão contidas na Tabela-3. As condições de armazenamento e idade da bebida também podem influenciar na presença de determinadas substâncias, por isso, as amostras analisadas foram escolhidas de modo que tivessem entre 1 e 2 meses de

fabricação (idade comumente encontrada nos supermercados) para as marcas nacionais e 4 a 6 meses para as marcas importadas. A Tabela-3 nos fornece a relação das 29 amostras de cerveja analisadas e suas principais características.

Tabela-3: Relação das amostras analisadas no estudo.

Código da Amostra	Cerveja	Características	Teor Alcoólico
P1	Schincariol	Cerveja Pilsen de baixa fermentação e médio teor alcoólico	4,7%
P2	Primus	Idem P1	4,7%
P3	Dado	Idem P1	4,6%
P4	Antarctica	Idem P1	4,8%
P5	Brahma	Idem P1	4,9%
P6	Skol	Idem P1	4,6%
P7	Heineken	Idem P1,	5,0%
P8	Budweiser	Idem P1	4,7%
P9	Warsteiner	Idem P1, puro malte	4,5%
P10	Sapporo Draft	Cerveja Draft, baixa fermentação e médio teor alcoólico	4,7%
P11	Miller	Cerveja Draft, baixa fermentação e médio teor alcoólico	4,7%
P12	Summer Draft	Cerveja Draft, baixa fermentação e médio teor alcoólico	4,7%
M1	Antarctica Malzbier	Cerveja Malzbier de baixa fermentação e médio teor alcoólico	4,7%
M2	Schincariol Malzbier	Cerveja Malzbier de baixa fermentação e médio teor alcoólico	4,7%
M3	Brahma Malzbier	Cerveja Malzbier de baixa fermentação e médio teor alcoólico	4,7%
M4	Xingu	Cerveja Malzbier de baixa	4,7%

		fermentação e médio teor alcoólico	
D1	Sweetheart	Cerveja Stout	2,0%
D2	Warsteiner Premium Dunkel	Cerveja escura com malte torrado de baixa fermentação, Premium Dunkel – Puro Malte	4,8%
D3	Schin Munich	Cerveja Escura de baixa fermentação e médio teor alcoólico	4,7%
D4	Ruddles County	Cerveja Forte e Escura Inglesa, tipo Ale, Alta Fermentação – Puro Malte	4,7%
D5	Murphy's	Cerveja Irlandesa tipo Stout	4,0%
D6	Abbot Ale	Cerveja Forte e Escura Inglesa, tipo Ale, Alta Fermentação – Puro Malte	5,0%
D7	Baden Bock	Cerveja tipo Bock – Puro Malte	5,0%
D8	Baden Stout	Cerveja Ale escura – Puro Malte	6,5%
D9	Bohemia Escura	Cerveja Escura de baixa fermentação e médio teor alcoólico	4,7%
D10	Caracu	Cerveja forte tipo Stout	5,3%
D11	Guinness	Cerveja Escura de baixa fermentação e médio teor alcoólico – (export)	4,2
D12	Kaiser Bock	Cerveja tipo Bock – Puro Malte	6,2%
D13	Mãe Preta	Cerveja Stout de baixa fermentação	3 a 4%

4.1 – Espectros de Massas *Fingerprint* de Cervejas

Analisando visualmente todos os espectros obtidos, em ambos os modos ESI(+)-MS e ESI(-)-MS e observando a presença dos íons mais intensos, é possível separá-los em três grupos, sendo que cada um corresponde a classes já existentes de cerveja, são elas: P = pales (lager, pilsen, draft), D = dark (bock, stout, dunkel) e M = Malt (Malzbier).

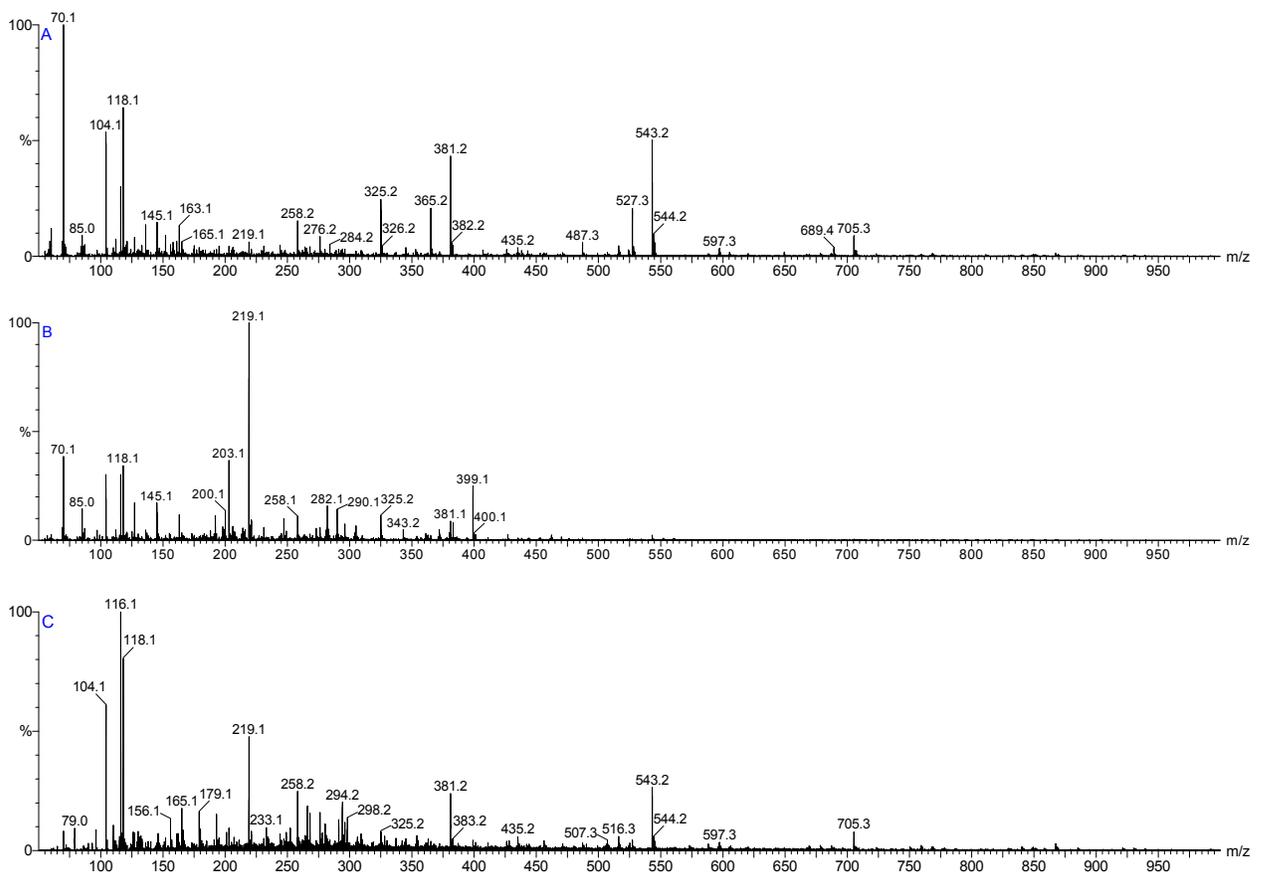


Figura-11: Espectros obtidos no modo ESI(+)-MS: A) cervejas claras tipo P, B) cervejas tipo malzbier, C) cervejas escuras tipo Dark.

4.1.1 – Espectros no modo ESI(+)-MS

A aquisição de espectros no modo positivo é realizada através da protonação das moléculas, sendo que neste trabalho foi utilizada a adição de ácido fórmico, ou através da formação de adutos com íons presentes em solução. A Figura-11A refere-se ao espectro ESI(+)-MS típico para uma cerveja P onde há picos intensos de cátions na faixa de 70 a 705 m/z. Pode-se perceber uma similaridade no espectro 11C, pertencente ao grupo das cervejas Darks, entretanto, diferenciando na intensidade e na ausência de alguns íons. Quanto ao espectro 11B, típico espectro ESI(+)-MS de uma cerveja Malzbier, não há íons presentes na região de m/z maior que 400 ua. As cervejas deste grupo são tipicamente conhecidas pelo seu gosto adocicado. Este sabor adocicado é resultado da adição de sacarose e caramelo na cerveja que tem por intuito reduzir o amargor proveniente do lúpulo e proporcionar uma coloração mais escura tornando um produto diferenciado no segmento de cervejas.

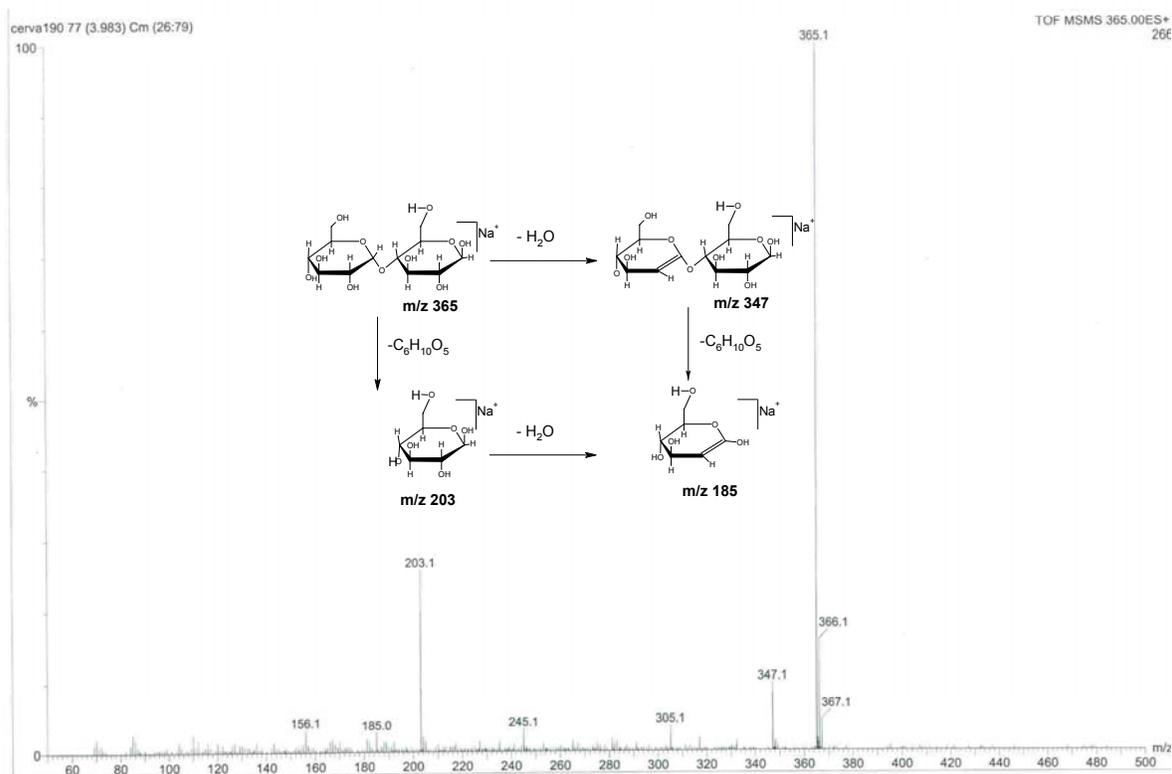


Figura-12: Espectro MS/MS CID do cátion m/z=365, aduto de maltose e sódio.

A fim de se obter maiores informações a respeito dos espectros, os íons mais intensos e característicos de cada espectro foram analisados através de CID.

Através dos espectros CID e comparando com dados da literatura, foi possível a identificação dos íons diagnósticos, entre eles, a presença de açúcares, oligômeros da maltose. No espectro 11A, referente às cervejas tipo P, os íons de m/z 365, 527 e 689 são referentes aos adutos de sódio $[M+Na^+]$ com maltose, maltotriose e maltotetraose respectivamente enquanto que os íons de m/z 381, 543 e 705 são referentes aos adutos de potássio $[M+K^+]$ com os mesmos carboidratos. A figura-12 contém o espectro de massas obtido através da análise CID do cátion m/z 365, referente ao aduto de maltose e sódio e a figura-13 se refere ao aduto da maltose com potássio.

Assim como as cervejas do tipo P, as cervejas do tipo D, também apresentam os íons referentes aos adutos de potássio $[M+K^+]$ com maltose, maltotriose e maltotetraose, porém, um aspecto interessante e característico das cervejas tipo Dark, quando comparadas com as cervejas tipo Pale, é que apenas os adutos de potássio com oligossacarídeos m/z 381, 543 e 705 $[M + K^+]$ são claramente observados, ao passo que os sinais referentes aos adutos de sódio $[M + Na^+]$, m/z 365, 527 e 689, possuem intensidade quase imperceptível ou estão ausentes. Isto mostra a capacidade da análise ESI(+)-MS em distinguir a razão de concentração $[K^+]/[Na^+]$ em cervejas dos tipos D e P.

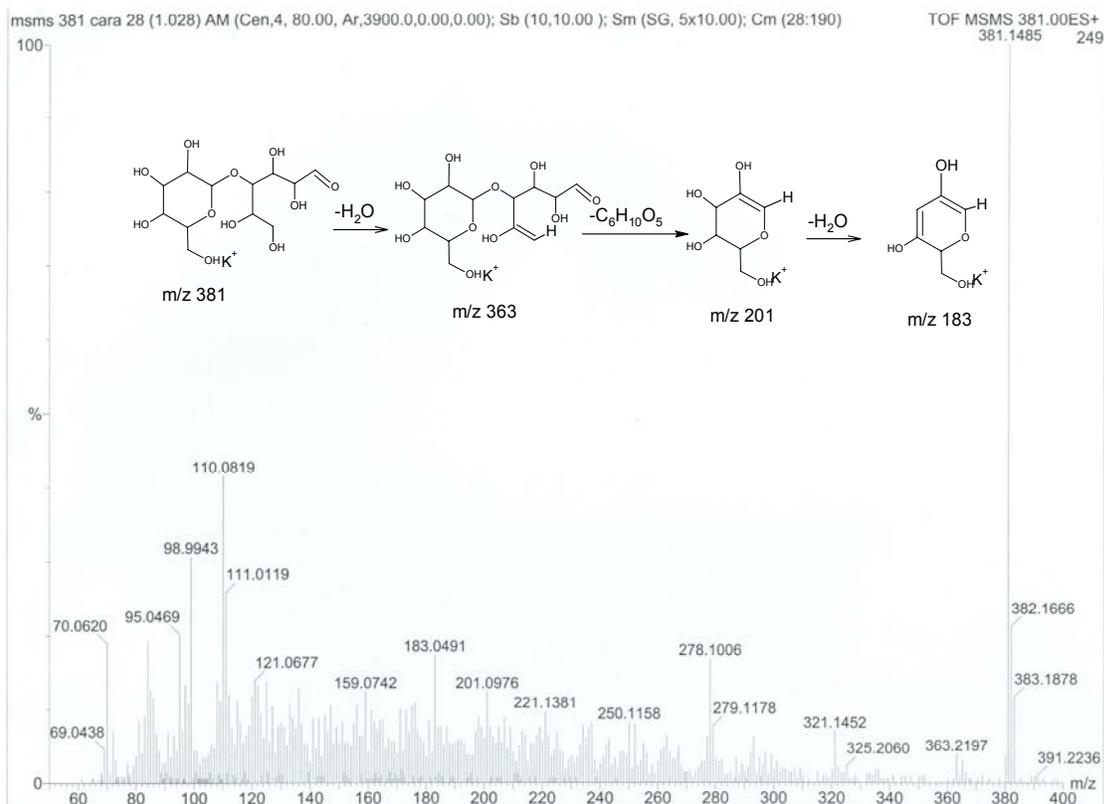


Figura-13: Espectro MS/MS CID do cátion $m/z=381$, aduto de maltose e potássio.

Pode ser observado que as cervejas tipo D possuem o íon de m/z 219 mais intenso do que as cervejas tipo P, o qual se refere ao aduto de glicose com potássio e está representado na Figura-14. Para as cervejas do tipo M, os íons mais característicos são os de m/z 203, 219 e 399, os quais, conforme seus respectivos espectros de MS/MS, se referem aos adutos de glicose com sódio $[M+Na^+]$ e potássio $[M+K^+]$ e dímero de glicose com potássio, respectivamente. Os íons referentes aos adutos de sódio e potássio com oligômeros da maltose não são observados.

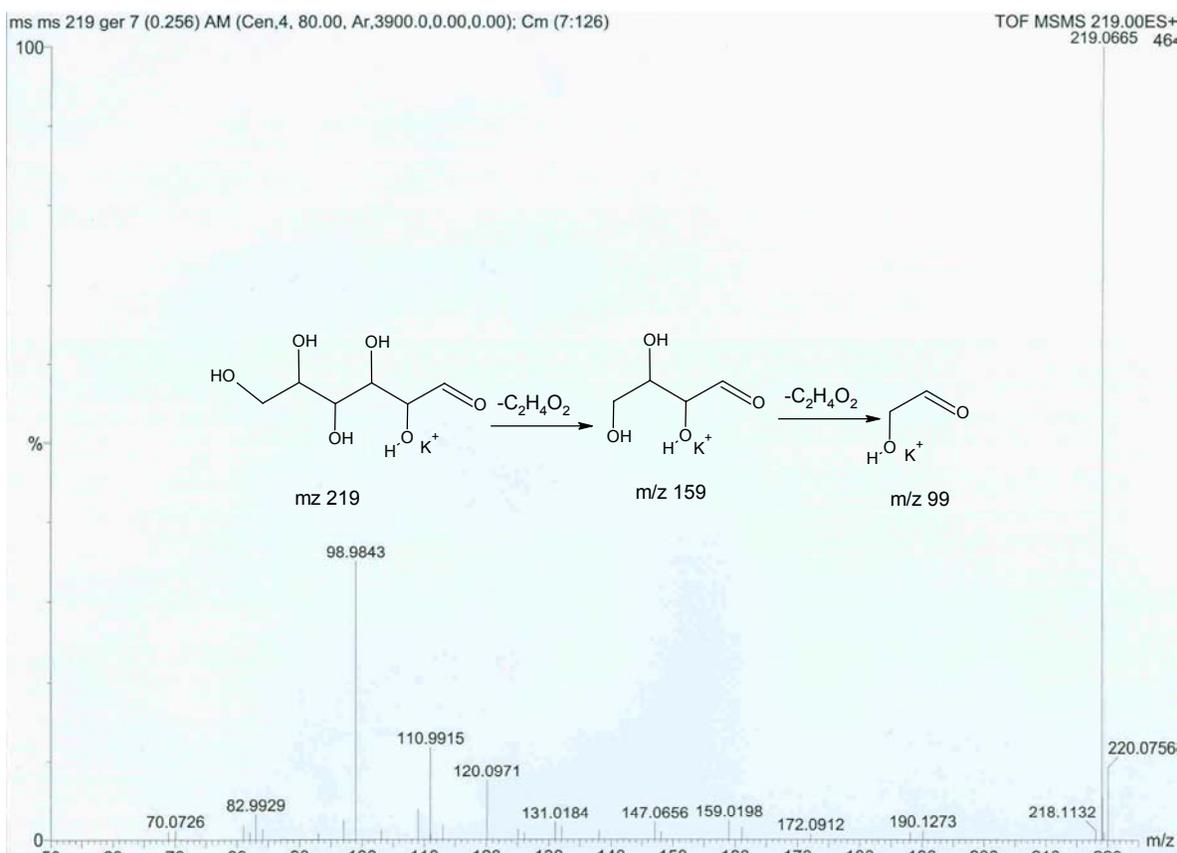


Figura-14: Espectro MS/MS CID do cátion $m/z=219$, referente ao aduto de glicose com potássio.

Levando em consideração que as cervejas Malzbiers diferem apenas no aspecto da adição de açúcares e caramelo em relação às cervejas Pilsens, sendo que esta adição é realizada apenas no final do processo de fabricação desta cerveja, está ocorrendo um efeito de supressão iônica, onde a glicose está inibindo a detecção dos íons referentes aos adutos de sódio e potássio com os oligômeros da maltose. A sacarose adicionada às cervejas malzbiers pode sofrer hidrólise auxiliada pelo baixo pH de uma cerveja (4,5 – 5,0), processo também conhecido como inversão da sacarose em função da inversão de rotação do plano da luz polarizada quando se aumenta a concentração de frutose. Em ionização por electrospray, supressão iônica é o efeito causado quando determinadas substâncias presentes na mesma gota são mais susceptíveis à ionização do que outras substâncias. A supressão iônica pode ocorrer em função de diferentes fatores como competição entre os componentes da matriz e do analito para atingir a

ionização, competição para conseguir acesso à superfície da gota, tensão superficial, diferenças entre polaridade dos componentes resultando em diferentes efeitos de solvatação, entre outros.⁴⁸

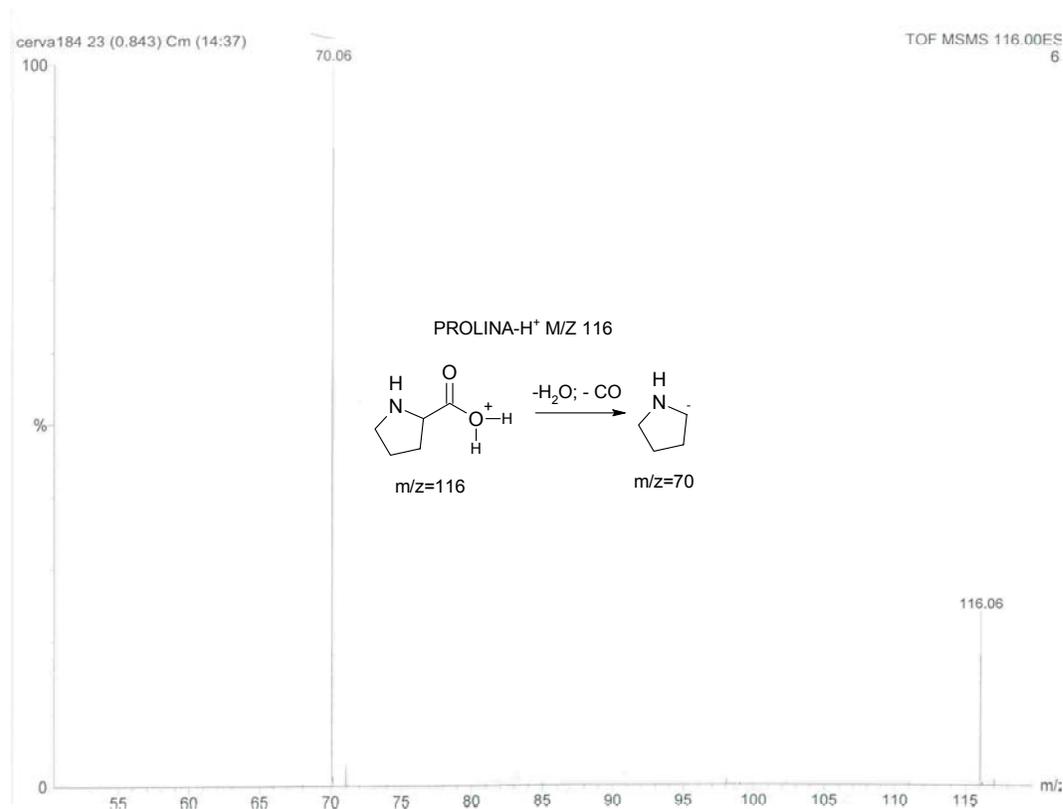


Figura-15: Espectro MS/MS CID do cátion m/z=116, referente à prolina protonada.

Outros íons que estão presentes nos espectros são os íons de m/z 163 e 325, referentes a anidroxose e dímero da anidroxose protonadas. Os íons de m/z 116 e m/z 118 estão presentes em todos os espectros obtidos sendo que para as cervejas do tipo D, o íon de m/z 116 é o íon base. De acordo com seu espectro obtido em MS/MS, procura de espectros realizada na base de dados NIST, e dados de substâncias presentes na cerveja, o íon de m/z 116, cujo espectro obtido através de CID está representado na Figura-15, pode ser referente a prolina protonada e o íon 118 um

aminoácido de fórmula geral $C_5H_{11}NO_2$, ácido-2-amino-3-metilbutanóico, representado na Figura-16. O íon de m/z 104 de intensidade bastante elevada possui fragmentações típicas de perda de NH_3 , H_2O , CO e CO_2 , podendo ser atribuído ao GABA, ácido- δ -amino butírico, de acordo com seu espectro de MS/MS presente na Figura-17.

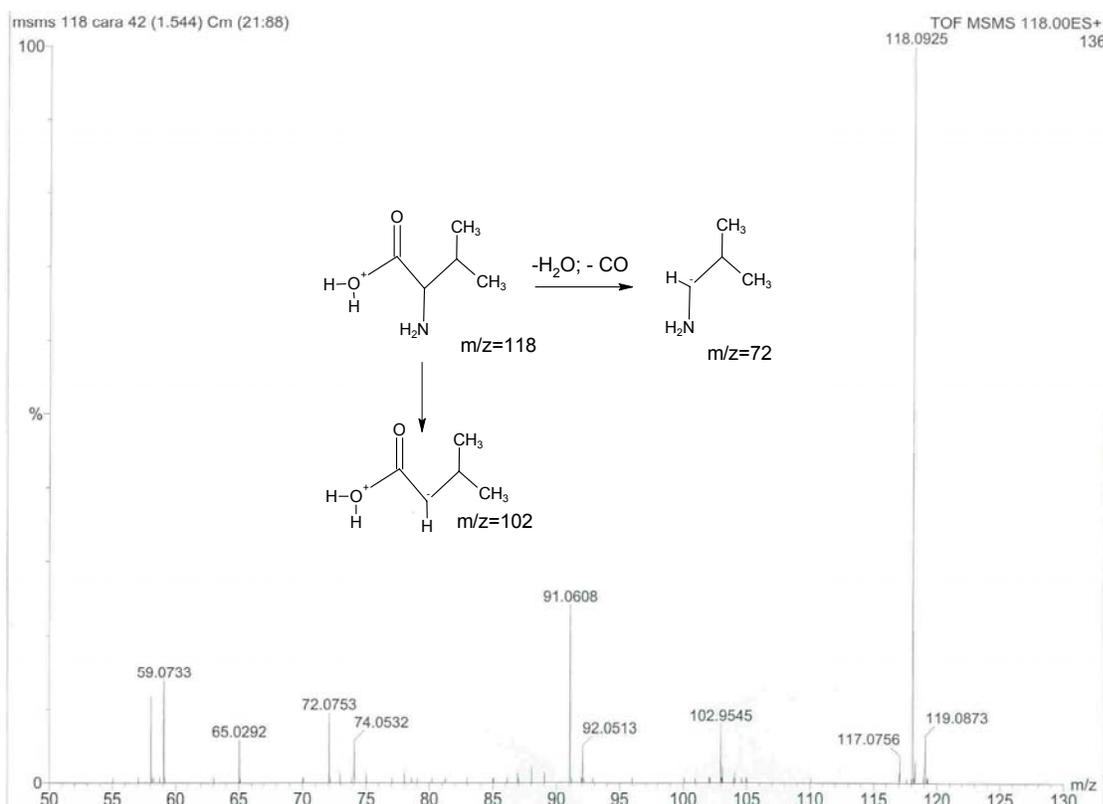


Figura-16: Espectro MS/MS CID do cátion $m/z=118$, referente ao ácido-2-amino-3-metilbutanóico protonado.

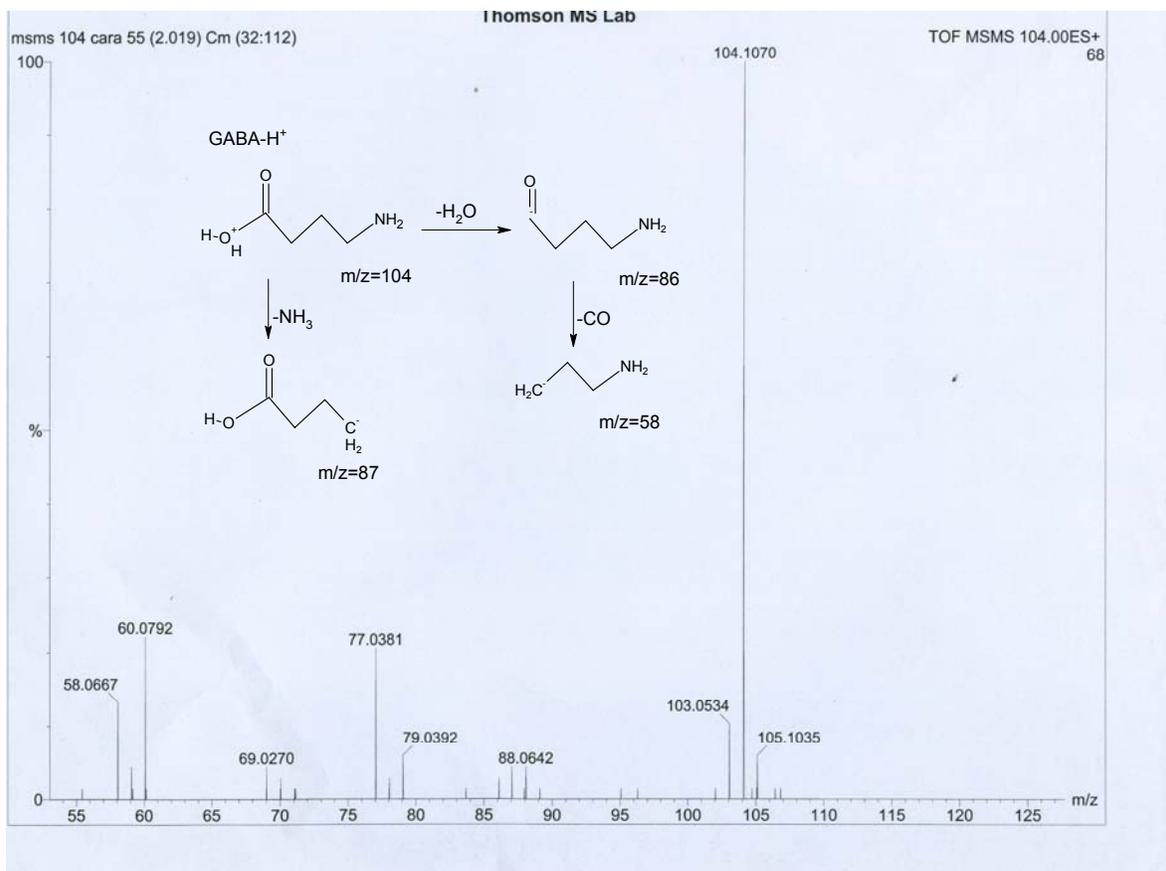


Figura-17: Espectro MS/MS CID do cátion $m/z=104$ referente ao ácido gama amino butírico protonado.

4.1.2 – Espectros no Modo ESI(-)-MS

Na obtenção de espectros de massa no modo negativo, há a desprotonação das moléculas auxiliada pela adição de hidróxido de amônio, sendo então observados os ânions e adutos das substâncias com ânions presentes. Os espectros obtidos no modo ESI(-)-MS demonstraram a presença de uma quantidade maior de íons, este fato já era esperado em função do baixo valor de pH dessa bebida.

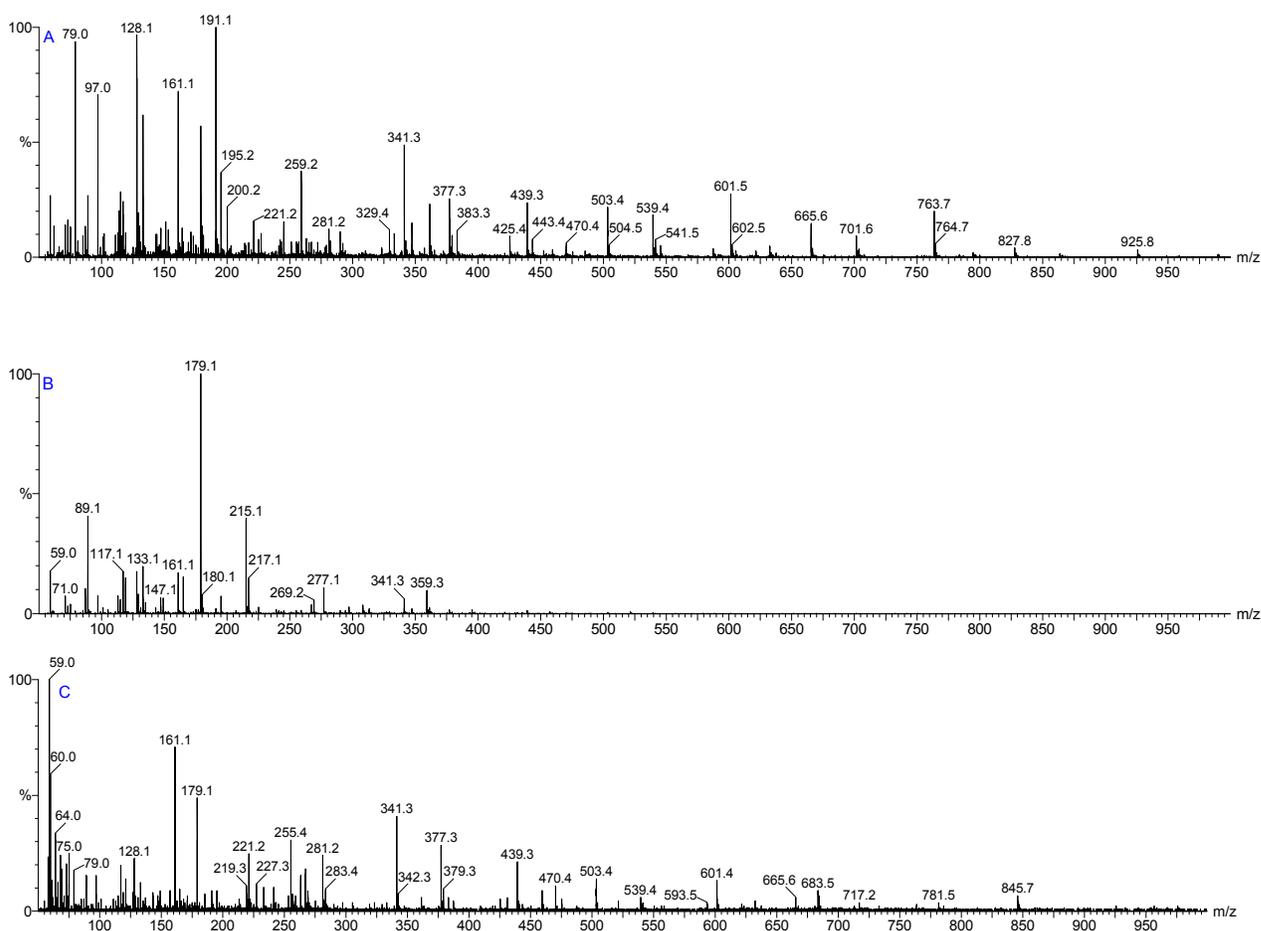


Figura-18: Espectro adquirido no modo ESI(-)-MS, A) cervejas claras tipo P, B) cervejas tipo Malzbier, C) cervejas escuras tipo Dark.

A Figura-18 contém os espectros adquiridos no modo negativo ESI(-)-MS e assim como nos espectros adquiridos no modo ESI(+)-MS, eles também permitiram a pré-separação nas mesmas classes que foram utilizadas no modo ESI(+)-MS. A figura 18A mostra o espectro ESI(-)-MS típico para cerveja tipo P. Os ânions mais intensos aparecem na faixa de m/z 79 a 925. Os íons de m/z 161, 179, 341, 503, 665, 827 correspondem às formas desprotonadas $[M-H]^-$ da anidroxose, glicose, maltose, maltotriose, maltotetraose e maltopentaose, respectivamente, fato observado e comprovado através dos espectros MS/MS. Os espectros obtidos através de MS/MS CID dos ânions de m/z 341 e 665 estão representados nas figuras 19 e 20 respectivamente.

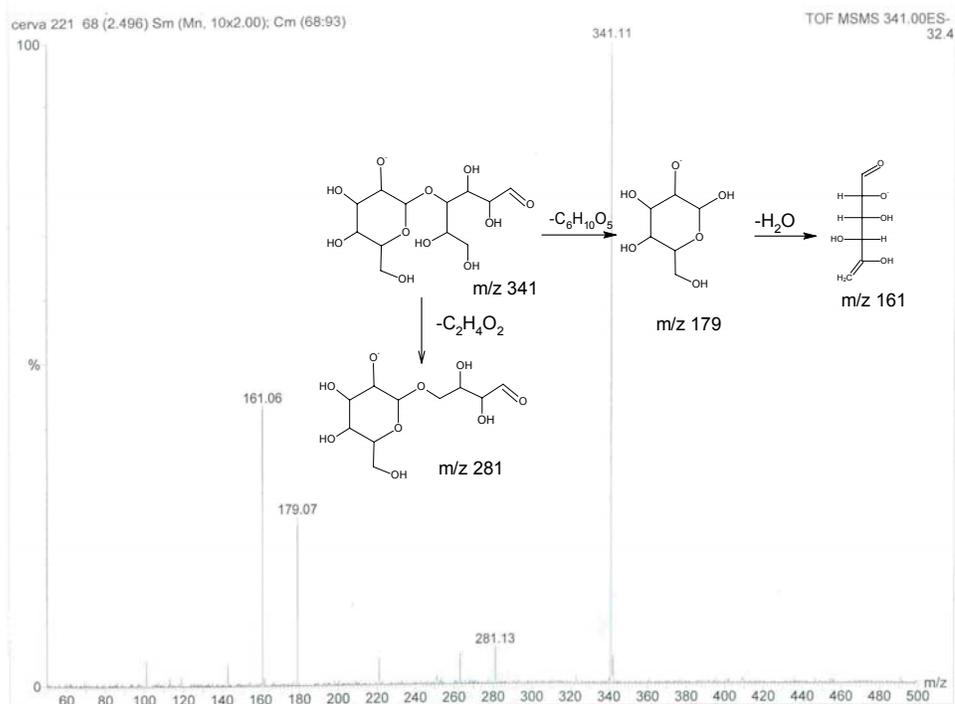


figura-19: Espectro MS/MS CID do ânion m/z=341 referente à maltose desprotonada.

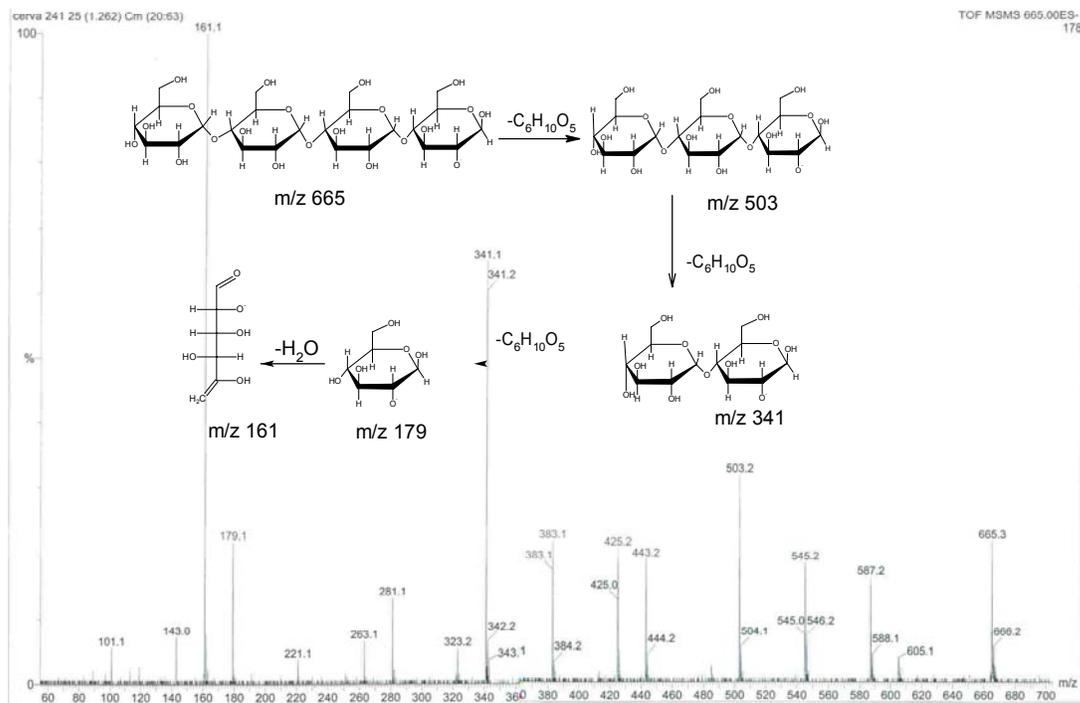


Figura-20: Espectro MS/MS CID do ânion m/z=665 referente à maltotetraose desprotonada.

Podem ser observados também os pares de ânions de m/z 377 e 379, 539 e 541, 701 e 703 correspondentes aos adutos com cloreto (razão isotópica de 3:1 de Cl^{35} e Cl^{37}) com maltose, maltotriose e maltotetraose. A Figura 21 mostra uma ampliação do espectro onde pode ser observado o par de ânions de m/z 377 e 379 e a Figura-22 foi obtida através de análise via CID do ânion m/z 377, atribuído ao aduto da maltose com cloreto, onde pode ser visualizada a primeira fragmentação referente à perda de uma molécula de HCl, originando o ânion da maltose desprotonada. Outros ânions que são característicos deste grupo de cerveja e também aparecem com intensidade no espectro de impressão digital são os de m/z 439 (aduto do íon 259 com glicose), m/z 601 (aduto do íon 259 com maltose), m/z 763 (aduto do íon 259 com maltotriose) e o íon 259 é um aduto do íon 79 com maltose.

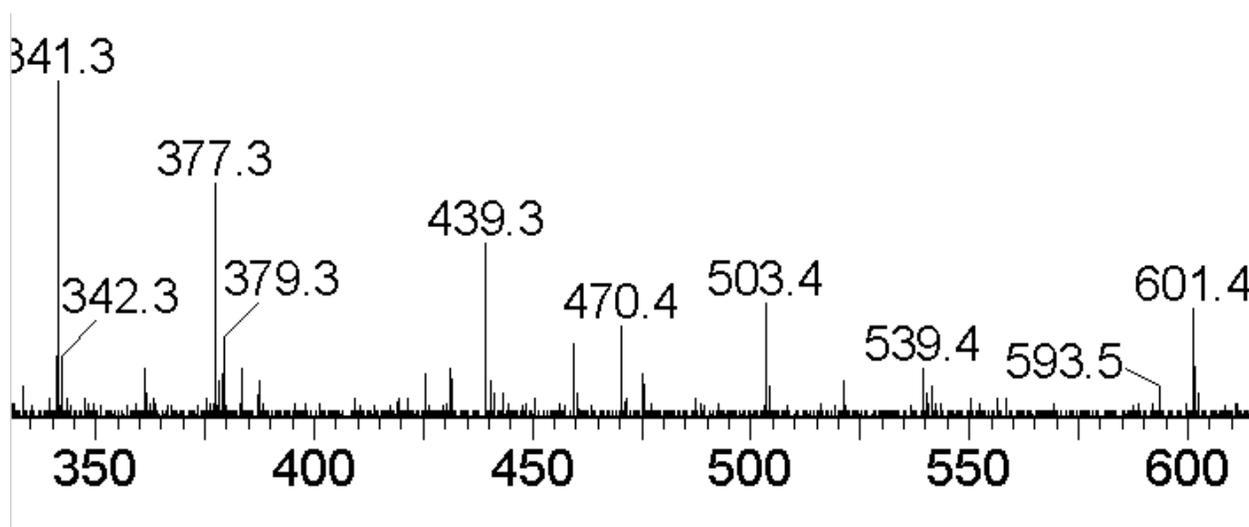


Figura-21: Ampliação da figura 18-C.

A Figura-18B ilustra o espectro ESI(-)-MS típico de uma cerveja tipo M. Como mencionado anteriormente, a adição de caramelo no processo de fabricação desta cerveja faz com que o pico mais intenso seja o m/z 179 referente ao ânion da glicose desprotonada seguido pelos picos de m/z 215 e 217 do par de isótopos do aduto da glicose com cloreto. O íon de m/z 359 aparece apenas nas cervejas tipo M e é referente

ao dímero da glicose desprotonada. Novamente pode ser observado o efeito de supressão iônica da glicose em relação aos outros íons correspondentes aos oligosacarídeos.

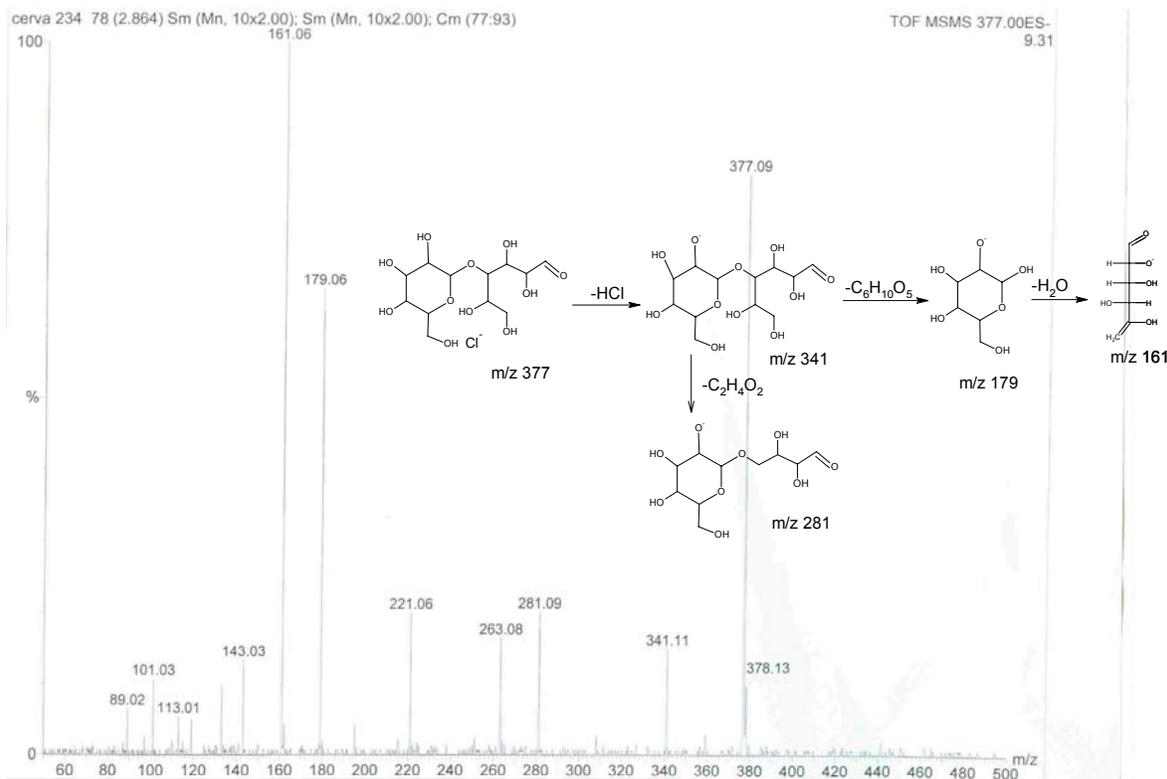


Figura-22: Espectro MS/MS CID do ânion m/z 377 referente ao aduto de maltose com cloreto.

O espectro de ESI(-)-MS para cervejas do tipo D, figura 18C, é bem parecido com as cervejas de tipo P, porém com menor quantidade de ânions e um par de ânions que se distinguem são os de m/z 161 e 179. Assim como nas cervejas Pales, o ânion 161 se refere a anidrohexose desprotonada, ao passo que o ânion de m/z 179, conforme seu espectro de MS/MS, é referente à glicose desprotonada. Outros picos característicos para cervejas tipo Dark são os de m/z 255 e o 683, sendo que o íon de m/z 683 se refere ao dímero de maltose desprotonada.

4.1.3 – Tratamento Estatístico de Dados – Quimiometria

Foi aplicado um tratamento estatístico de dados – Análise de componentes principais (PCA) para verificar sua eficácia na classificação das cervejas. Para realizar um PCA, é necessário construir uma matriz de dados ($m \times n$) onde as linhas (m) conterão as amostras e as colunas (n) as variáveis, neste caso, as colunas eram o conjunto dos 20 maiores íons (m/z) de cada espectro e as linhas as respectivas intensidades de cada amostra naquela relação m/z . Agrupando os 20 maiores íons para cada espectro resultou em uma matriz com 96 variáveis. A Tabela-4 representa um esquema de construção de matriz de dados para PCA.

	Var (1)	Var (2)	Var (3)	Var (n)
Amostra(1)				
Amostra(2)				
Amostra(3)				
Amostra(m)				

Tabela-4: Esquema de construção de uma matriz de dados para PCA.

Como pré-tratamento dos dados, foi utilizado Centrado na Média, que é a subtração de cada valor pela média dos valores, realizado em cada coluna (variável). Através deste pré-tratamento, cada valor fica agrupado ao redor da média sendo que os valores mais diferenciados ficarão mais distantes desta média e conseqüentemente obtém-se um melhor agrupamento entre as amostras similares.

O PCA é resultado de uma combinação linear entre os dados da matriz original resultando em uma nova matriz de dados organizada em ordem de maior variância. Os dados contidos na matriz original (muitas variáveis) são transformados em um novo conjunto de variáveis (vetores ou auto vetores), normalmente chamados de Componentes Principais, PC1, PC2, PC3, etc, sendo que a maior quantidade de representação dos dados da matriz original estará contida nas primeiras componentes principais, reduzindo assim a dimensão de variáveis. Plotando-se os valores de PC1 vs PC2, PC3, etc, obtém-se uma visualização gráfica deste novo modelo de dados. São fornecidos dois tipos de gráficos: o gráfico de SCORES que representa as novas coordenadas das amostras neste novo sistema de Componentes Principais, sendo que

neste gráfico é possível visualizar as principais formações de grupos e classes, de acordo com as informações extraídas da matriz de dados, e o gráfico de LOADINGS, que representa o peso que cada variável, proveniente da matriz original, teve na construção deste modelo estatístico.

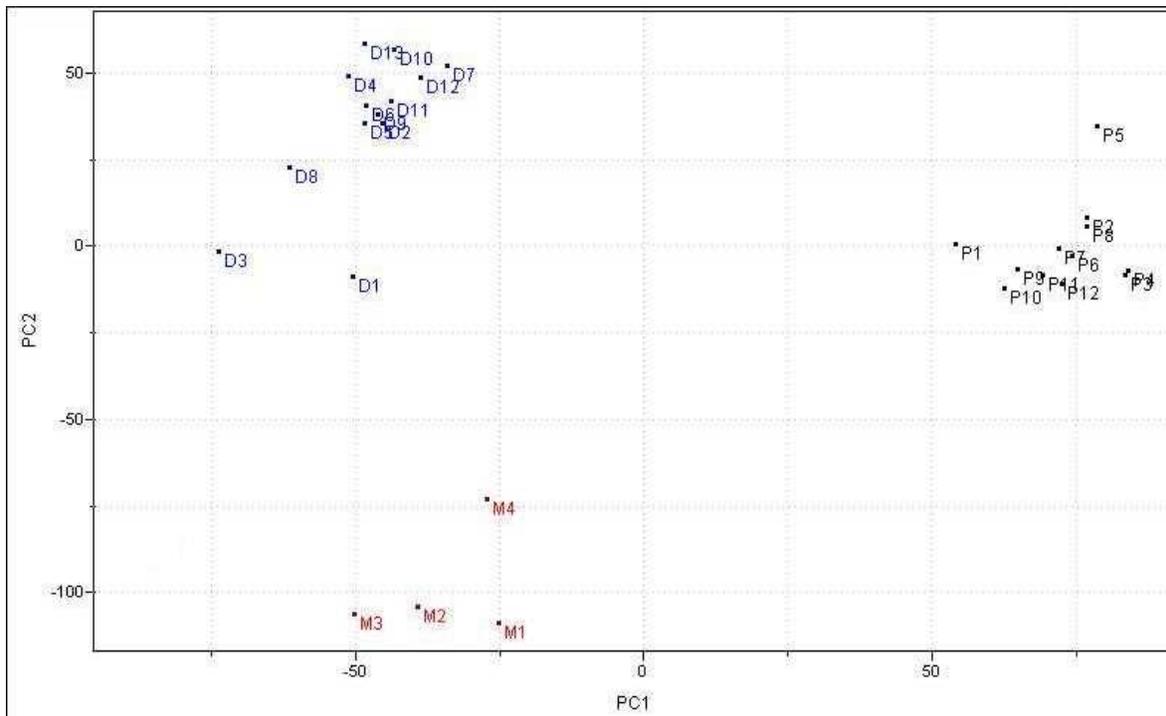


Figura-23: Gráfico de SCORES-2D obtido dos dados dos espectros adquiridos no modo ESI(+)-MS. PC1=41,6% e PC2 = 27,0%

A Figura-23 contém o gráfico de SCORES realizado a partir de PC1 e PC2, onde claramente pode ser visualizada a formação de três grupos distintos, sendo que o grupo formado pelas cervejas Malzbier (M) e Dark (D) possuem valores negativos para PC1 e são separados através de PC2, ao passo que os grupos Dark (D) e Pale (P) possuem valores positivos para PC2 e são separados por suas diferenças de valores em PC1. Além dessas separações em três grupos, pode ser observado que, para o grupo das cervejas Dark, as amostras D1, D3 e D8 parecem estar mais deslocadas do grupo enquanto que para o grupo formado com as cervejas do tipo P, as amostras P1 e P5 também demonstram este deslocamento. O gráfico de SCORES da Figura-23 é um gráfico onde são plotados PC1 e PC2. Se for utilizada também a PC3, obtém-se uma

quantidade maior de informação e representatividade dos dados com a visualização de um gráfico em 3 dimensões, conforme pode ser visualizado na Figura-24.

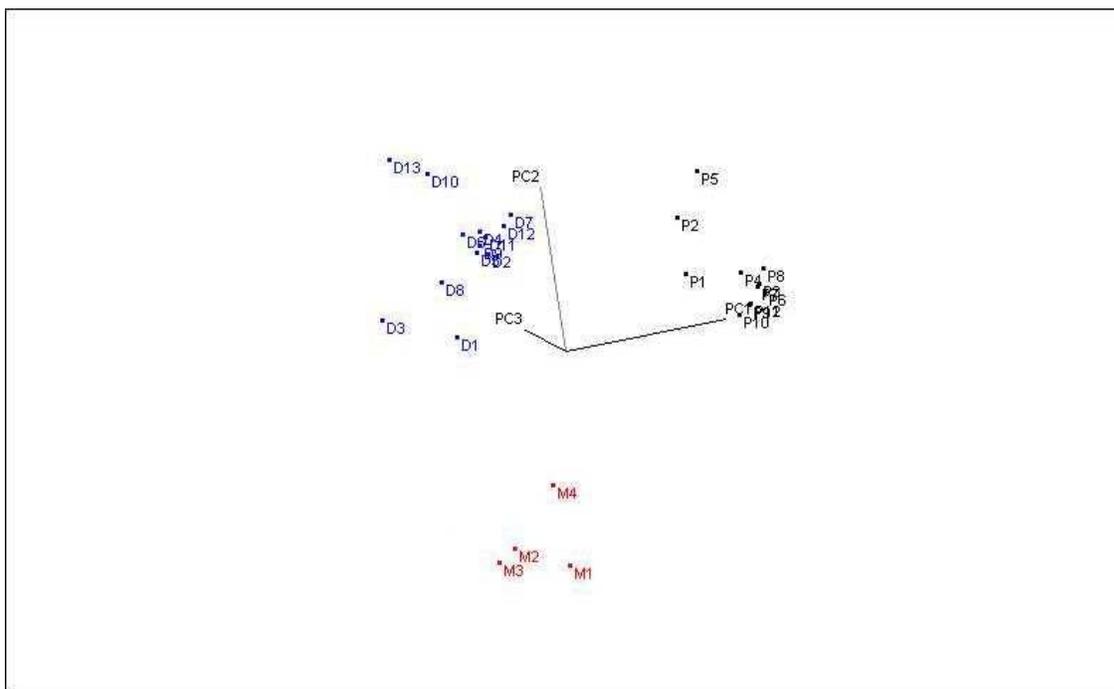


Figura-24: Gráfico de SCORES-3D obtido dos dados dos espectros adquiridos no modo ESI(+)-MS. PC1 = 41,6%, PC2 = 27,0% e PC3 = 8,0%.

É possível verificar que além das cervejas D1, D3 e D8, as cervejas D10 e D13 também estão mais deslocadas do grupo formado pelas outras amostras do tipo Dark. Um fator em comum entre estas amostras, é que, com exceção da amostra D1, todas são do tipo Stout. As cervejas do tipo Stout, segundo a literatura são produzidas pelo processo de Alta fermentação, porém na amostra D13, o rótulo menciona cerveja tipo Stout de baixa fermentação. Outras características desse tipo de cerveja são um valor de extrato original maior, o que confere uma característica de cerveja mais “encorpada” e teor alcoólico mais alto, chegando a 6,5%, por exemplo, na amostra D8. Estas amostras possuem maior valor para os íons de m/z 381 e 435. Ainda nas amostras do tipo Dark, as amostras D7 e D12 apresentam valores menos negativos em PC1 do que as demais, estas amostras são cervejas do tipo Bock. Isto demonstra que a análise por

Espectrometria de massas com ionização por electro spray pode dividir as amostras de cervejas tipo Dark em três subgrupos: Stout, Bock e Dunkel (escuras).

Esta melhor visualização dos dados utilizando três Componentes Principais no gráfico de Scores também proporcionou a visualização de que para as cervejas do tipo Pale, as amostras P1, P2 e P5 se diferenciam do grupo. Estas três amostras, assim como outras cervejas presentes no grupo Pale são cervejas Pilsen, as mais consumidas no Brasil, sendo assim suas diferenças podem estar na utilização da matéria prima, como tipo de blend de malte, variedade de lúpulo, cepa da levedura na fermentação, etc. Analisando a matriz de dados, estas amostras possuem valores de intensidade maior para os íons de m/z 325, 543 e 705, todos referentes a açúcares presentes nas cervejas.

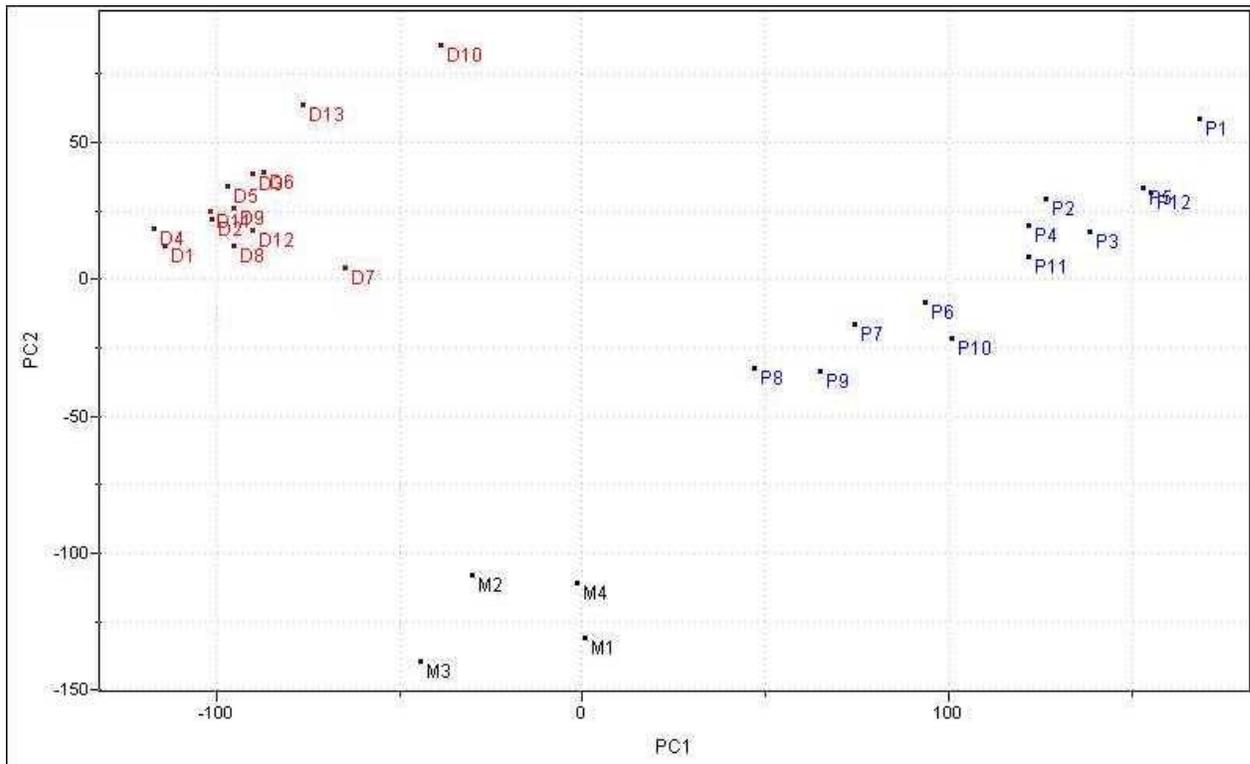


Figura-25: Gráfico de Score-2D obtido a partir dos dados dos espectros adquiridos no modo ESI(-)-MS. PC1 = 57,2% e PC2 = 17,2%.

A Figura-25 mostra o mesmo gráfico de SCORE, porém obtido da Análise de Componentes Principais, realizada sobre os dados dos espectros no modo ESI(-)-MS. Este gráfico também demonstra claramente a separação das amostras analisadas, em

três grupos distintos, porém com maior espalhamento no grupo das cervejas tipo Pale. A fim de obter maiores informações, foram plotados os gráficos de SCORES utilizando PC1 e PC2 e PC1, PC2 e PC3 (Figuras 25 e 26), de modo que o gráfico 3D, teve rotação em seus eixos até que fosse observada maior separação dentro dos grupos. O grupo das cervejas tipo D revela neste caso, que somente as amostras D13 e D10 estão mais deslocadas e observando a matriz de dados dos espectros obtidos no modo ESI(-)-MS, essas duas amostras possuem quantidade maior para o íon de m/z 341, referente a maltotriose desprotonada, sendo assim a análise PCA, aplicada aos dados de espectros obtidos no modo ESI(+)-MS são melhores do que o modo ESI(-)-MS para a separação em subgrupos das cervejas tipo Dark.

As amostras do tipo P aparecem separadas em 3 subgrupos: I-P (P1, P2, P12 e P5), II-P (P3, P4 e P11) e III-P (P6, P7, P8, P9 e P10). O subgrupo I-P, contém as mesmas amostras que tiveram uma subdivisão no modo ESI(+)-MS, porém com a inclusão da amostra P12. Analisando a matriz de dados, é possível observar que as maiores diferenças entre os subgrupos estão nas intensidades dos sinais de m/z 179, 341 e 377, referentes à maltose e maltotriose desprotonadas e aduto do íon cloreto e maltotriose. O íon de m/z 439, também possui estas características para esses subgrupos, sendo que as intensidades são maiores no subgrupo I-P e menores no subgrupo III-P. Outra característica interessante do subgrupo III-P é de que as amostras de cervejas tipo Pale importadas estão todas neste subgrupo o que pode ser analisado como uma característica de cerveja mais envelhecida e/ou que passou por um processo de envelhecimento precoce, causado em função das condições de transporte e armazenamento até chegar ao consumidor final.

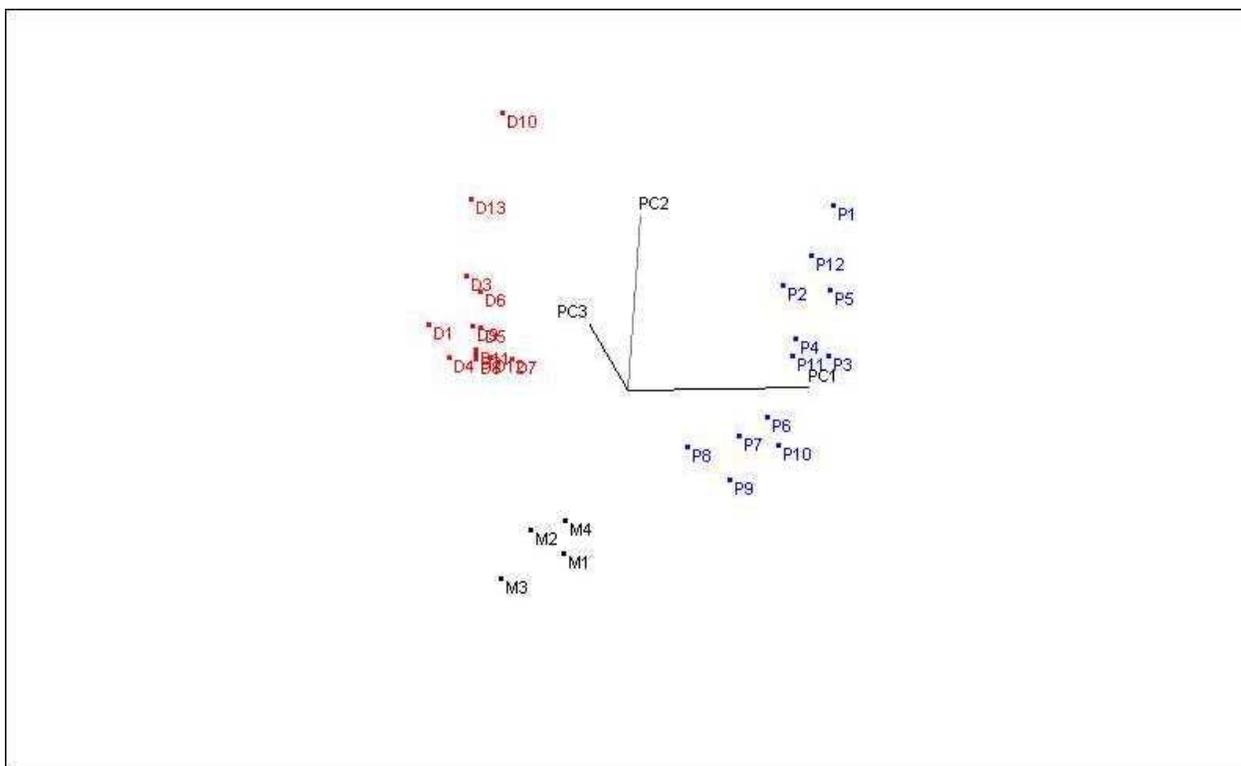


Figura-26: Gráfico de Score-3D obtido a partir dos dados dos espectros adquiridos no modo ESI(-)-MS. PC1 = 57,2%, PC2 = 17,2% E PC3 = 8,8%.

A Análise de Componentes Principais fornece também o gráfico de Loadings, o qual revela, quais as variáveis que tiveram maior influência na construção desse novo sistema de coordenadas. A Figura-27 mostra o gráfico de Loadings obtido da matriz de dados no modo ESI(+)-MS onde pode ser observado maior destaque para os cátions de m/z 70, 116, 203, 219, 381.

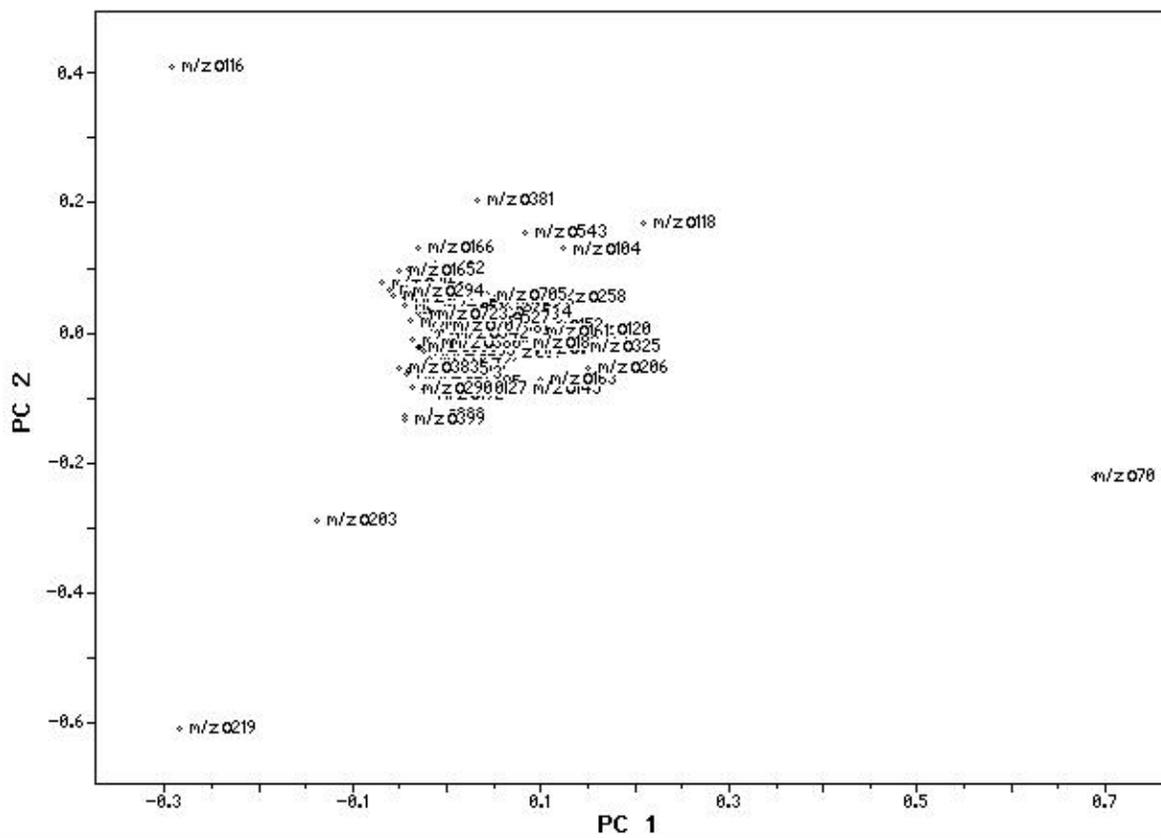


Figura-27: Gráfico de Loadings gerado a partir dos dados dos espectros obtidos no modo ESI(+)-MS.

A Figura-28 mostra o gráfico de Loadings gerado da matriz no modo ESI(-)-MS, neste caso há um maior número de ânions que tiveram mais peso na construção da nova matriz. Esses ânions são: 59, 60, 96, 101, 128, 130, 133, 161, 179, 191, 215, 341, 363, 377.

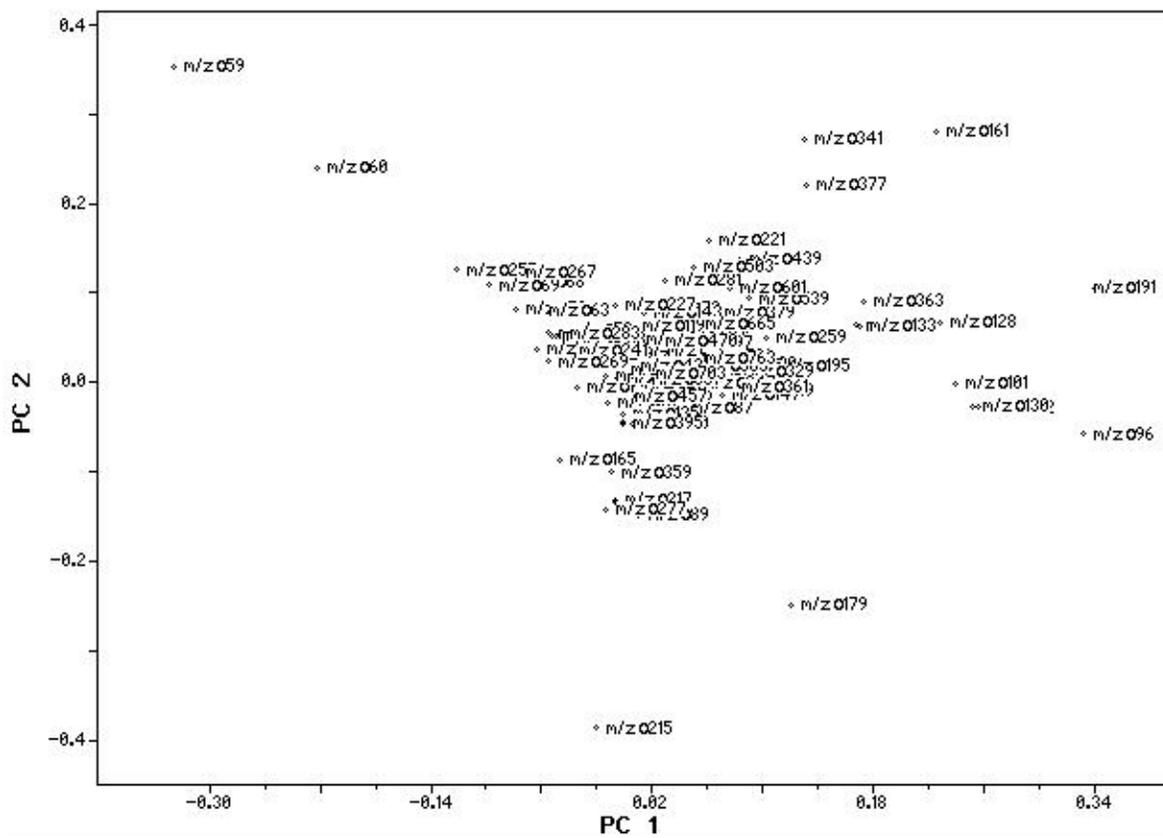


Figura-28: Gráfico de loadings gerado a partir dos dados dos espectros obtidos no modo ESI(-)-MS.

Conforme mencionado anteriormente, a nova matriz de dados é construída ordenando as componentes principais em ordem de maior variância representada, ou seja, quanto que cada PC representa do modelo anterior. A tabela 5 traz a % de variância contida em cada componente principal nos modos ESI(+)-MS e ESI(-)-MS. No modo ESI(+)-MS, a variância acumulada nas três primeiras PC's é de 76,6% enquanto que para o modo ESI(-)-MS, este valor é de 83,2%. A maior porcentagem de variância acumulada representada pelas PC's para o modo ESI(-)MS está de acordo com o que foi observado para os gráficos de SCORES e LOADINGS em ambos modos, onde o gráfico de SCORE, obtido do modo ESI(-)-MS, separa melhor as amostras de cerveja tipo P e o gráfico de LOADINGS contém um número maior de íons (ânions) com valores mais significativos.

Tabela-5: Porcentagem da variância explicada pelos 10 componentes principais para as amostras analisadas no modo de ESI(+)-MS e ESI(-)MS.

Componente Principal	Modo ESI(+)-MS		Modo ESI(-)-MS	
	% Variância explicada para cada CP	% Variância total explicada	% Variância Explicada para cada CP	% Variância total explicada
1	41,6	41,6	57,2	57,2
2	27,0	68,6	17,2	74,4
3	8,0	76,6	8,8	83,2
4	5,4	82,1	4,3	87,5
5	4,1	86,2	2,9	90,4
6	3,2	89,4	1,7	92,1
7	1,8	91,2	1,3	93,4
8	1,6	92,8	1,2	94,6
9	1,3	94,0	0,9	95,5
10	1,0	95,0	0,7	96,1

A aquisição de espectros tipo *fingerprint* de diferentes amostras de cervejas e utilização de quimiometria nos dados obtidos na análise de ESI(+)-MS e ESI(-)-MS revelaram, em primeiro instante, a separação das cervejas em três grupos: um de cervejas claras, um de cervejas escuras e outro de cervejas escuras e adoçadas. Alguém poderia dizer que essa separação poderia ser realizada por um degustador bem treinado ao invés de analisá-las em um equipamento de alto valor, porém a análise sensorial está sujeita a variáveis inerentes ao comportamento humano, como por exemplo, alterações nos sentidos das papilas degustativas em função de alimentação, saúde ou até variações emocionais no degustador que podem causar erros. Para identificar uma amostra de cerveja como pertencente a uma determinada classe, com exatidão, é preciso muito mais do que, por exemplo, analisar simplesmente a coloração da bebida, pois isso é

facilmente manipulável. A obtenção de espectros *fingerprinting* em cervejas, a partir de espectrometria de massas com ionização por electrospray, permite a obtenção de espectros com a presença e intensidade de íons diagnósticos característicos de cada tipo de cerveja. Através da Análise de Componentes Principais aplicada a estes dados foi possível separar em grupos e também em subgrupos de acordo com a particularidade existente entre essas amostras analisadas.

A aquisição de espectros fingerprint de cervejas foi um trabalho pioneiro nesta área. Esta análise revela os íons diagnósticos, ou seja, os íons mais representativos e através da utilização de MS/MS, é possível a seleção, análise e identificação de íons específicos. As informações obtidas nesse trabalho mostraram que esta técnica pode ser utilizada também em outras análises como classificação de cervejas segundo seu grau de envelhecimento e degradação, possível razão da separação do subgrupo III-P das amostras Pale, identificação e caracterização de novos marcadores responsáveis pela degradação, seja natural, forçada (permanência sob temperaturas mais elevadas), ou degradação pela incidência de luz e novos marcadores para identificação do ponto ótimo de fermentação e maturação. Essas possibilidades estão sendo estudadas por outros alunos do grupo.

5 – CONCLUSÕES

Este trabalho comprovou o grande potencial que a técnica ESI-MS possui para a análise de cervejas, adquirindo espectros em poucos minutos a partir de amostras que necessitam de pouca preparação e podem ser injetadas sem prévia separação cromatográfica, facilitando e agilizando a análise. Cada espectro de fingerprint, por si só, revela visualmente os íons característicos de cada tipo de amostra e quando estes dados passam por tratamento estatístico (análise de componentes principais), essas amostras de cervejas foram separadas em grupos e subgrupos distintos de acordo com suas similaridades. O modo ESI(+)-MS forneceu melhor separação para as amostras do tipo Dark, separando as cervejas tipo Stout, Bock e cervejas escuras, em subgrupos distintos e também neste modo, foi possível observar a presença de amino ácidos como por exemplo a prolina e GABA. As cervejas do tipo Pale foram separadas em subgrupos de uma maneira mais plausível através dos dados obtidos no modo ESI(-)-MS. Esta análise demonstra poder ser utilizada tanto na pesquisa como no controle de qualidade de uma indústria cervejeira, analisando substâncias presentes no produto acabado ou em pontos específicos durante a sua fabricação de uma maneira rápida e eficiente.

6 – BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Siuzdak, G., "An Introduction to Mass Spectrometry Ionization: An excerpt from The expanding role of mass spectrometry em Biotecnologia" 2^a Ed.; MCC Press, San Diego, **2005**;
- ² Cole, R. B., "Electrospray Ionization Mass Spectroscopy"; John Wiley & Sons Inc.: New York, **1997**;
- ³ Russel, D. H., "Experimental Mass Spectrometry", Plenum Press, New York, **1994**;
- ⁴ Raftery, M. J. Geczy, C. L., *J. Am. Soc Mass Spectrometry*, **2002**, 13, 709-718
- ⁵ Williams, J. D., Flanagan, M., Lopez, L., Fischer, S., Miller, L.A.D., *Journal of Chromatography A*, **2003**, 1020, 11-26;
- ⁶ Cooks, R. G., Zhang, D. X., Koch, K. J., Gozzo, F. C., Eberlin, M. N., *Anal. Chem.* **2001**, 73(15), 3646;
- ⁷ Rioli, V., Gozzo, F. C., Shida, C. S., Krieger, J. E., Heimann, A. S., Linardi, A., Almeida, P. C., Hyslop, S., Eberlin, M. N., Ferro, E. S. J., *Biol. Chem.*, **2003**, 278 (10), 8547-8555;
- ⁸ Koch, K. J., Gozzo, F. C., Nanita, S. C.; Takats, Z., Eberlin, M. N., Cooks, R. G., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2002**, 41(10), 1721;
- ⁹ Eberlin, M. N., Meurer, E., Santos, L. S., Pilli, R. A., *Org. Lett.*, **2003**, 5(9), 1391-1394;
- ¹⁰ Gaumet, J. J., Strouse, G., *Material Research Society Simposium*, **2002**, 726;
- ¹¹ Gaumet, J. J., Strouse, G., *Journal of American Society Mass Spectrometry*, **2000**, 11, 338-344;
- ¹² de la Mora, J. F, Berkel, G. J. V, Enke, C. G., Cole, R. B., Sanchez, M. M., Fenn, J. B., *Journal of Mass Spectrometry*, **2000**, 35, 939-952;
- ¹³ Cole, R. B., *Journal of Mass Spectrometry*, **2000**, 35, 763-772;
- ¹⁴ Chapman, J. R., "Practical Organic Mass Spectrometry"; John Wiley & Sons; New York **1993**;
- ¹⁵ Hans, X. L., Gross, R. W.. *Analytical Biochemistry*, **2001**, 265, 88-100;
- ¹⁶ Schoonjans, V., Taylor, N., Hudson, B. D., Massart, D. L., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, 28, 537-548;

-
- ¹⁷ Sawaya, A. C. H. F., Tomazela, D. M., Cunha, I. B. S., Bankova, V. S., Marcucci, M. C., Custódio, A. R., Eberlin, M. N., *The Analyst*, **2004**, 129, 739-744;
- ¹⁸ Zhang, X. R., Minear, R. A., Guo, Y. B., Hwang, C. J., Barret, S. E., Ikeda, K., Shimizu, Y., Matsui, S., *Water Research*, **2004**, 38, 3920-3930;
- ¹⁹ Moller, J. K., Catharino, R. R., Eberlin, M. N., *The Analyst*, **2005**, 130, 890-897;
- ²⁰ Araujo, A. S.; Rocha, L. L. R.; Tomazela, D. M.; Sawaya, A. C. H. F.; Almeida, R. R.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N., *The Analyst*, **2005**, (130) 884-889;
- ²¹ Kowalski, B., *Analytical Chemistry*, **1980**, 52, 112R-122R;
- ²² Einax, J. W., Zwanziger, H. W., Geiss, S., “*Chemometrics in Environmental Analysis*”, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1997**;
- ²³ Hendriks, M. M., de Bôer, J. H., Smilde, A. K., “*Robustness of Analytical Chemical Methods and Pharmaceutical Technological Products*”, Elsevier, Amsterdam, **1997**;
- ²⁴ Kyle, B., “*Successful Industrial Experiments*”, VCH Publishers, New York, **1995**;
- ²⁵ Brereton, R. G., “*Chemometrics Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*”, John Wiley and Sons, Chichester, **2003**;
- ²⁶ Gurden, S. P., Martin, E. B., Morris, A. J., *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **1998**, 44, 319-330;
- ²⁷ Ferreira, M. C., Antunes, A. M., Melgo, M. S., Volpe, P. L. O., *Química Nova*, **1999**, 22, n.5
- ²⁸ Tasic, L., Rittner, R., *Journal of Molecular Structure (Theochem)*, **2004**, 47-49;
- ²⁹ http://www.sindicerv.com.br/mercado/txt_mercado.htm;
- ³⁰ Relatório do BNDES de 23/01/2002; Cerveja: Um mercado em expansão; Maria Helena de Oliveira - AO1/GESET2;
http://www.bndes.gov.br/conhecimento/setorial/gs2_10.pdf
- ³¹ Hardwick, W. A., Dekker, M., “*Handbook of Brewing*”, New York, **1995**;
- ³² Vargas, R.E.S., Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 54, DE 5 DE NOVEMBRO DE 2001 DOU DE 07/11/2001. Publicada no diário oficial da União em 07 de outubro de 2001;
- ³³ <http://www.thebeerstore.ca/ultimate/beer-terminology.html>;
- ³⁴ <http://www.beerchurch.com/gloss.htm>;

-
- ³⁵ <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/beer/water.htm>;
- ³⁶ Edney, M.J; LaBerge, D.E.; Langrell, D.E.; *J. Am. Soc. Brewing Chemists*, **1998**, 164-168;
- ³⁷ HAAS Hop Products INC, Technical Report, **1998**, USA;
- ³⁸ Keukeleire, D.; *Química Nova*, **2000**; 23(1); 108-112;
- ³⁹ Hofte, A.J.P., van der Hoeven, R.A.M.; *J. Am. Soc. Brewing Chemists*, **1998**, 56(3), 118-122;
- ⁴⁰ Roberts, M.T., Lewis, A.C., *J. Am. Soc. Brewing Chemists*, **2002**, 60(3), 116-121;
- ⁴¹ Sakuma, S., Hiromi, A., Ohkochi, M., *J. Am. Soc. Brewing Chemists*, **2000**, 58(1), 26-29;
- ⁴² Madigan, D.; *J. Am. Soc. Brewing Chemists*, **1998**, 56(4), 146-151;
- ⁴³ Nyborg, M., Outtrup, H., Dreyer, T., *J. Am. Soc. Brewing Chemists*, **1999**, 57(1), 24-28;
- ⁴⁴ Foster, R.T., Samp, E.J., Patino, H., *J. Am. Soc. Brewing Chemists*, **2001**, 59(4), 201-210;
- ⁴⁵ Araki, S., Takashio, M., Shinotsuka, K., *J. Am. Soc. Brewing Chemists*, **2002**, 60(1), 26-30;
- ⁴⁶ Trelea, I. C.; Landaud, S.; Latrille, E.; Corrieu, G.; *J. Am. Soc. of Brewing Chemists*; **2001**, 59(2), 77-87;
- ⁴⁷ Uchida, M; Ono, M.; *J. Am. Soc. of Brewing Chemists*; **2000**, 58(1), 8-13;
- ⁴⁸ Annesley, T. M; *Clinical Chemistry*; **2003**, 49, 1041-1044.