

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Influência da técnica de “*dry hopping*” e da aplicação de
 β -glicosidases no perfil de compostos voláteis de cervejas

Daiane Danelli

Porto Alegre

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Influência da técnica de “*dry hopping*” e da aplicação de
 β -glicosidases no perfil de compostos voláteis de cervejas

Daiane Danelli

Monografia apresentada ao Curso de
graduação em Engenharia de Alimentos
como um dos requisitos para obtenção do
título de Engenheiro de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Porto Alegre

2015

Influência da técnica de “*dry hopping*” e da aplicação de β -glicosidases no perfil de compostos voláteis de cervejas

Daiane Danelli

Aprovado em:

Pela banca examinadora:

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Orientador

Prof. Dr. Vitor Manfroi

Prof. Dr. Eliseu Rodrigues

Agradecimentos

À UFRGS e ao ICTA que através de seus professores, servidores e estrutura, me propiciaram uma formação de qualidade.

Ao Prof. Plinho, meu orientador, pela orientação, pela amizade, pelos conhecimentos compartilhados e pelo apoio tanto na realização deste trabalho quanto durante o intercâmbio. Merci.

Ao professor Rafael, pela contribuição para a realização deste trabalho.

À professora Simone, pela amizade, pelos ensinamentos compartilhados e por sempre se mostrar disposta em ajudar nos momentos de dúvidas.

À professora Cláudia, por ter disponibilizado o seu laboratório para a realização das análises.

Aos professores do ICTA envolvidos com o programa Capes-Brafagri, por propiciar aos alunos essa oportunidade e por ter confiado em mim para integrar o primeiro grupo de alunos participantes do programa, foi, sem dúvida, uma experiência enriquecedora para a minha formação profissional.

Aos colegas e amigos dos laboratórios de enzimologia e de biocatálise e tecnologia enzimática, pelo apoio, pelos conhecimentos compartilhados e também pelos momentos de descontração. Principalmente à Franciele Zaluski, pelo apoio e contribuição desde o início do trabalho e ao Gustavo, pela ajuda com as análises.

Aos colegas e amigos da graduação, por compartilhar os conhecimentos, às dúvidas, às frustrações e os momentos de alegria. Especialmente à Paula, Joana, Ju Venturini, Lívia, Ju Engel e Érika, a amizade de vocês foi essencial durante esse período e continuará sendo.

Aos amigos do intercâmbio, vocês foram fundamentais durante esses dois anos.

À prof. Erna[†], pela amizade, pelo carinho, pelos ensinamentos compartilhados, por ser um exemplo tanto como profissional quanto como pessoa. Muito obrigada por ter contribuído para a construção da base da profissional que me tornei. Os ensinamentos serão eternos.

À minha mãe que sempre fez tudo o que estava ao seu alcance para que eu pudesse continuar estudando. À minha irmã, pelo apoio incondicional.

[†]*In Memoriam.*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	OBJETIVOS.....	11
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
3.1.	Matérias primas utilizadas na produção de cerveja	13
3.2.	Processo de produção de cerveja	14
3.3.	Lupulagem e perfil sensorial de cerveja	16
3.4.	Aplicação da enzima β -glicosidase em alimentos	17
3.5.	Identificação de compostos voláteis em bebidas	18
4.	ARTIGO.....	21
5.	CONCLUSÃO GERAL	38
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

Influência da técnica de “*dry hopping*” e da aplicação de β -glicosidases no perfil de voláteis de cervejas

Autora: Daiane Danelli

Orientador: Plinho Francisco Hertz

RESUMO

O Brasil é um dos maiores produtores de cerveja, entretanto o consumo per capita ainda é baixo, demonstrando potencial do mercado no país. Se por um lado a produção em grande escala é predominante no país, por outro, vem crescendo a produção artesanal, que prima pela qualidade e diversidade organoléptica. Tanto num caso quanto no outro, a aplicação de lúpulo é fundamental e a de enzimas uma alternativa bastante interessante. O lúpulo é um dos quatro ingredientes essenciais na produção de cerveja e além de amargor, confere às cervejas aromas, entretanto grande parte desses aromas são perdidos durante a fervura. Diversos estudos mostram que a utilização da enzima β -glicosidase contribui para a melhora do perfil aromático de sucos de fruta, vinho e chás através da hidrólise de precursores de aromas glicosilados. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil aromático de cerveja, comparando cervejas com a técnica clássica de lupulagem, técnica clássica mais aplicação de glicosidase, com aplicação de lúpulo pós-fervura, conhecida como *dry hopping*, e com *dry hopping* seguida de aplicação de glicosidase. Para avaliar o perfil de voláteis dos diferentes tratamentos o método usado foi cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas, com a técnica de microextração em fase sólida em *headspace* (HSPME-GCMS). Assim, foram identificados 21 compostos voláteis em mosto lupulado, enquanto que na amostra de cerveja após a fermentação, foram identificados 20 compostos voláteis. Após a aplicação de *dry hopping*, o número de compostos identificados aumentou para 30. Dentre esses os compostos somente o geraniol e terpineol apresentaram aumento na concentração relativa com diferença estatisticamente significativa, após o tratamento com glicosidase. Os resultados indicam que a modificação do perfil de compostos voláteis de cervejas pode ser obtido com a aplicação de *dry hopping* e da enzima β -glicosidase.

Palavras-chave: Cerveja, β -glicosidases, *dry hopping*, HSPME-GCMS.

Lista de Figuras

FIGURA 1 FLUXOGRAMA SIMPLIFICADO DO PROCESSAMENTO DE CERVEJA (FONTE: VARNAM, SUTHERLAND;1994)	14
FIGURA 2 MÉDIAS E DESVIOS PADRÃO DA ÁREA RELATIVA DOS COMPOSTOS GERANIOL, LINANOL E ALPHA TERPINEOL ENCONTRADOS NA AMOSTRAS DE MOSTO LUPULADO(MO) E MOSTO LUPULADO COM ADIÇÃO DE β -GLICOSIDASE (ME).....	28
FIGURA 3 ÁREA RELATIVA (%) DOS COMPOSTOS MIRCENO E LINALOL NAS AMOSTRAS FO, FD E FE	34

Lista de tabelas

TABELA 1 COMPOSTOS IDENTIFICADOS POR HSPME-GMCS, TEMPO DE RETENÇÃO (RT), INDÍCE DE RETENÇÃO (IR) E CONCENTRAÇÃO RELATIVA, DAS AMOSTRAS MOSTO LUPULADO (MO) E DEMOSTO LUPULADO COM ADIÇÃO DE β -GLICOSIDASE (ME)	27
TABELA 2 COMPOSTOS VOLÁTEIS IDENTIFICADOS POR HSPME-GMCS, TEMPO DE RETENÇÃO (RT), INDÍCE DE RETENÇÃO (IR) E CONCENTRAÇÃO RELATIVA, NA AMOSTRA DE CERVEJA FERMENTADA (FO)	31
TABELA 3 COMPOSTOS VOLÁTEIS IDENTIFICADOS POR HSPME-GMCS, TEMPO DE RETENÇÃO (RT), INDÍCE DE RETENÇÃO (IR) E CONCENTRAÇÃO RELATIVA, NAS AMOSTRAS DE CERVEJA FERMENTADA COM APLICAÇÃO DE DRY HOPPING (FD) E DE CERVEJA FERMENTADA COM APLICAÇÃO DE DRY HOPPING E COM ADIÇÃO DE β -GLICOSIDASE FE	32

Lista de abreviaturas

AR Área relativa

FD Amostra de cerveja fermentada com aplicação de dry hopping

FE Amostra de cerveja fermentada com aplicação de dry hopping e enzima β -glicosidase

FO Amostra de cerveja fermentada

GC Cromatografia gasosa

HSPME Microextração em fase sólida em *headspace*

KI Índice de kovats

ME Amostra de mosto lupulado com aplicação da enzima β -glicosidase

MO Amostra de mosto lupulado

MS Espectrômetro de massas

RI Índice de retenção

RT Tempo de retenção

1. INTRODUÇÃO

A cerveja originou-se juntamente com as primeiras bebidas fermentadas, que eram feitas de uva, tâmaras, cevada ou mel, provavelmente na Mesopotâmia, onde a cevada crescia em estado selvagem. Há indícios que a cerveja já era fabricada com cevada maltada na Babilônia há mais de 8.000 anos. (DRAGONE; SILVA, 2010).

Segundo o decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009, cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo (BRASIL, 2009).

Embora o Brasil seja o terceiro maior consumidor mundial de cerveja, sendo precedido apenas pelos Estados Unidos e pela China, em termos de consumo *per capita* o Brasil cai para a vigésima sétima colocação, o que demonstra o potencial de crescimento existente. Além disso, a produção nacional cresceu aproximadamente 60% entre 2003 e 2013 (BORGES, 2015).

O início da utilização de enzimas nos alimentos confunde-se com a própria história dos primeiros relatos da produção de pão, cerveja e vinho. No século XX as enzimas começaram a ser empregadas largamente na indústria de alimentos, a partir da produção e comercialização de quimosina, aplicada à produção de queijos. Hoje as enzimas são utilizadas na produção de diversos alimentos, como pães, cervejas, vinhos, produtos lácteos, óleos, aromas. As enzimas são também empregadas na indústria química, como na de detergentes, têxtil e indústria de couros. A larga aplicação de enzimas deve-se a sua alta especificidade, capacidade de operar sob condições moderadas de pH, temperatura e pressão, com alta atividade, além disso, os produtos que utilizam reações enzimáticas são considerados produtos naturais (FERNANDES, 2010).

Os compostos relacionados aos aromas das plantas apresentam-se em parte, glicosilados, o que os torna não voláteis. A enzima β -glicosidase, de fonte exógena, vem sendo aplicada em sucos de frutas, vinhos e chás para liberação de compostos voláteis e conseqüente melhora no perfil aromático desses produtos (AKACHA; GARGOURI, 2015).

O lúpulo é empregado na produção de cerveja para conferir amargor ao produto pela isomerização, durante a fervura, dos α -ácidos e também para conferir aroma e sabor, devido a presença de óleos essenciais. A tecnologia de *dry hopping*, ou seja, a aplicação de uma carga extra de lúpulo após a fermentação da cerveja permite melhorar o perfil lupulado de cervejas,

uma vez que em torno de 90% dos compostos voláteis do lúpulo são perdidos durante a fervura(HALEY; PEPPARD, 1983). Essa técnica, apesar de sua utilização na produção de alguns tipos de cervejas, possui literatura técnica e científica escassa.

Assim o objetivo geral do presente trabalho é avaliar a influência da técnica de *dry hopping* e da aplicação da enzima β -glicosidase na modificação do perfil de voláteis durante o processamento da cerveja.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral: Avaliar a influencia da técnica de *dry hopping* e da aplicação da enzima β -glicosidase na modificação do perfil de voláteis durante o processamento da cerveja.

Objetivos específicos:

- Utilizar a técnica de *dry hopping* em cervejas e identificar os compostos voláteis liberados durante essa etapa do processo.
- Identificar compostos voláteis liberados pela enzima β -glicosidase quando aplicada em mosto e cerveja.
- Determinação e comparação do perfil de compostos voláteis em diferentes amostras de mosto e cerveja.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Matérias primas utilizadas na produção de cerveja*

A cerveja é constituída por quatro ingredientes básicos, a água, o malte, o lúpulo e as leveduras.

A água é a matéria-prima em maior quantidade na cerveja, entre 92 e 95% em peso. A quantidade e qualidade de sais minerais dissolvidos na água e os compostos orgânicos presentes podem influenciar nas reações químicas e enzimáticas que ocorrem durante o processamento da cerveja. Assim, a água utilizada na produção de cerveja deve ser potável e, com alcalinidade e concentração de minerais adequadas, de modo a não interferir no sabor e nas reações durante o processamento (SILVA, 2005).

Tecnicamente, o malte é definido como a matéria-prima resultante da germinação controlada, de qualquer cereal. O malte mais utilizado na produção de cervejas é o malte de cevada. No grão malteado o amido presente está parcialmente hidrolisado em cadeias menores e até monossacarídeos, se tornando menos duro e mais solúvel em comparação ao estado inicial no grão, além disso, o grão malteado possui também enzimas no seu interior que são fundamentais para o processo cervejeiro, como amilases, peptidases e hemicelulases (DRAGONE; SILVA, 2010).

Em alguns tipos de cerveja, o malte é submetido também ao processo de torrefação, visando a modificação do sabor e aroma do produto final, que conterà compostos provenientes das reações de Maillard e de caramelização (YAHYA; LINFORTH; COOK, 2014).

O lúpulo confere a cerveja o sabor amargo, resultado da presença de α -ácidos e β -ácidos. Esse ingrediente é também fundamental para o aroma da cerveja, possui em sua composição entre 0,5 e 2% de óleos essenciais, nesse grupo, mais de 200 compostos já foram identificados. Além disso, propriedades de conservação da cerveja também estão associadas ao lúpulo (MOLL, 1991).

A função primordial da utilização de leveduras na produção de cervejas é a fermentação, ou seja, a transformação dos açúcares fermentescíveis em etanol e gás carbônico. Durante a fermentação são produzidos, pelo metabolismo secundário das leveduras, ésteres que, apesar de presentes em pequenas quantidades, conferem sabor e aroma

às cervejas. Entre os principais ésteres comumente presentes em cervejas, pode-se citar o feniletil acetato, o isoamil acetato e o etilcaprilato (VERSTREPEN et al.,2003).

3.2. Processo de produção de cerveja

O processo de fabricação difere segundo o tipo de cerveja e a indústria onde é produzida, entretanto algumas etapas são essenciais para a fabricação de cervejas, essas etapas estão ilustradas no fluxograma de processamento simplificado, na Figura 1.

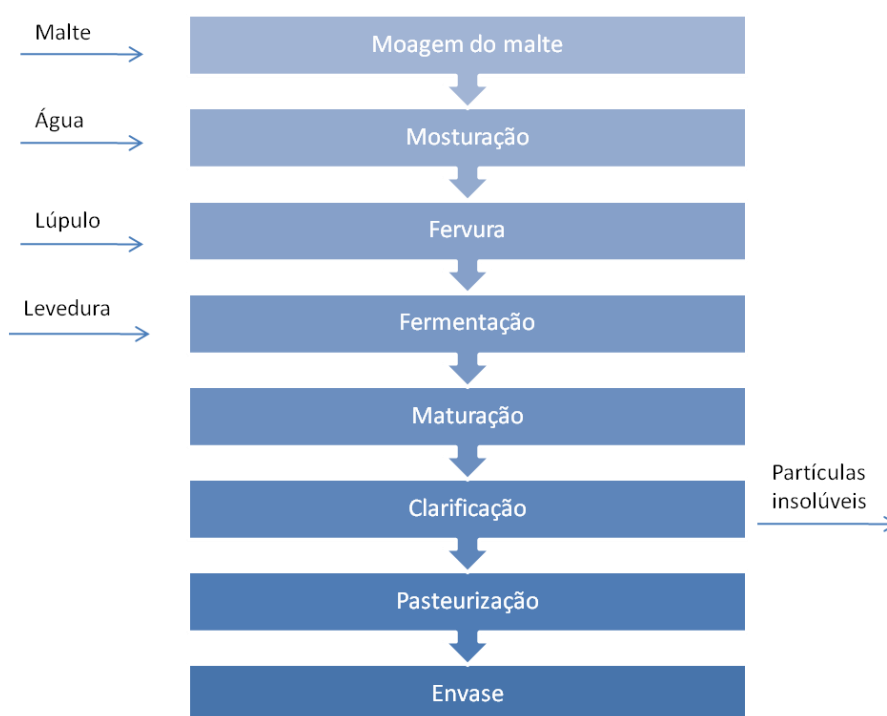


Figura 1 Fluxograma simplificado do processamento de cerveja (Fonte: VARNAM, SUTHERLAND;1994)

A moagem do malte tem como objetivo reduzir o grão de malte de forma uniforme ocorre o rompimento da casca, exposição e desintegração do endosperma, que melhora a atuação enzimática durante a mosturação. Na mosturação a água é adicionada ao malte, as substâncias solúveis serão diretamente solubilizadas e outras, insolúveis, serão solubilizadas pela ação enzimática (principalmente pelas amilases), o tempo e a temperatura são determinados de acordo com a característica desejada, geralmente, ao final dessa etapa o mosto apresenta entre 70 e 80% de carboidratos fermentescíveis, como a maltose, a maltotriose e a glicose (DRAGONE; SILVA, 2010).

Na fervura ou lupulagem, o lúpulo é adicionado, com o objetivo de conferir amargor, aroma e estabilidade à cerveja. A principal transformação que ocorre durante a fervura é a conversão dos α -ácidos (ou humulonas) em iso- α -ácidos (ou iso-humulonas) que conferem

amargor à cerveja. Ao final da fervura o resíduo de lúpulo é retirado, evitando amargor excessivo ou a liberação de aromas indesejados (KEUKELEIRE, 1999).

Na fermentação as leveduras, geralmente do gênero *Saccharomyces*, são adicionadas tendo como principal objetivo a produção de etanol, entretanto são formados outros compostos que contribuem para o aroma e sabor da cerveja como o ácido acético, que assim como o etanol, é produto do metabolismo primário e ainda outros compostos, originários do metabolismo secundário, como os ésteres (DRAGONE; SILVA, 2010).

As cervejas podem ser classificadas de acordo com o tipo de fermentação, as mais comuns, são as dos tipos *Ale* e *Lager*. Nas cervejas tipo *Ale* ou de alta fermentação, geralmente são utilizadas leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* e o processo ocorre entre 18 e 22°C, por 3 à 5 dias, quando as leveduras são arrastadas até o topo do tanque pelas bolhas de CO₂. Nas cervejas tipo *lager* ou de baixa fermentação, utiliza-se leveduras da espécie *Saccharomyces carlsbergensis* a fermentação ocorre entre 7 e 15°C, por 7 à 10 dias, quando as leveduras são recuperadas na base do tanque de fermentação (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

Durante a maturação, a cerveja fica em repouso sob refrigeração por algumas semanas ou até por alguns meses. Nessa etapa ocorrem algumas mudanças, como a produção de compostos, entre eles o diacetil e de alguns ésteres, que contribuem para a formação de aroma. Também ocorre ainda a produção de CO₂ que contribui para a carbonatação da cerveja. Além disso, ocorre também a precipitação das leveduras ainda presentes, o que facilita a etapa seguinte (DRAGONE; SILVA, 2010).

Após a maturação ocorre a clarificação que visa à retirada de leveduras de partículas coloidais e outras partículas insolúveis. A clarificação pode ser realizada por sedimentação, utilização de clarificantes, centrifugação e filtração, ou utilização de duas ou mais dessas técnicas combinadas (SILVA, 2005).

A pasteurização tem por objetivo principal prolongar a vida útil das cervejas, evitando a deterioração por microrganismos contaminantes. A pasteurização pode ser realizada antes do envase, em um trocador de placas operando com alta pressão para evitar a perda de gás ou após o envase, em um túnel de pasteurização (VARNAM; SUTHERLAND, 1994).

A cerveja é então envasada em latas ou garrafas. O cuidado principal nesta etapa é evitar que a garrafa possua oxigênio no *headspace* para evitar a oxidação durante o transporte

e armazenagem. O procedimento mais comum é jatear água esterilizada, o que induz a formação de espuma e expulsão do oxigênio da garrafa (DRAGONE; SILVA, 2010).

3.3. Lupulagem e perfil sensorial de cerveja

O lúpulo é um dos quatro ingredientes essenciais utilizados na produção de cerveja, conferindo ao produto sabor amargo, aroma e estabilidade da espuma (KEUKELEIRE, 1999).

O lúpulo, *Humulus lupulus*, é uma planta da família *Cannabaceae*, originária da Europa. É uma planta perene, que pode atingir até 6 metros de altura. A planta é dióica, ou seja, os órgãos femininos e masculinos se desenvolvem em plantas separadas, a diferença entre essas plantas está no tamanho da inflorescência. A parte da planta utilizada para a produção de cerveja são os cones ou inflorescências femininas, pois nestes encontram-se as glândulas de lupulina, onde estão os componentes de interesse: os óleos essenciais e resinas (HORNSEY, 2007).

Os principais componentes das resinas de amargor são os α -ácidos. Os α -ácidos são constituídos principalmente de humulonas. Durante a lupulagem esses compostos são isomerizados originando iso- α -ácidos. Os iso- α -ácidos são os compostos que conferem à cerveja sabor amargo e a estabilidade da espuma (TANIGUCHI et al., 2014).

Os β -ácidos são importantes constituintes das resinas, podendo representar 10% da composição do lúpulo. Estruturalmente, são muito similares aos α -ácidos, entretanto são menos ácidos e são mais hidrofóbicos, portanto mais insolúveis em cervejas, sendo considerados muitas vezes como irrelevantes para a indústria cervejeira. O extrato de β -ácidos pode ser utilizado para a síntese de iso- α -ácidos (STEENACKERS; COOMAN; VOS, 2015).

Os óleos essenciais são os compostos associados ao aroma de lúpulo. Os componentes dos óleos essenciais variam de acordo com o tipo de lúpulo, em estudo realizado por Ligor et al. (2014) foram identificados 98 compostos diferentes, os compostos majoritários dos óleos essenciais são os monoterpenos (β -mirceno) e os sesquiterpenos (α -Humuleno e β -cariofileno).

O linalol e o geraniol são monoterpenos que também são amplamente encontrados em lúpulos, o estudo realizado por Peacock et al. (1981), mostrou que os dois compostos estão associados, sensorialmente, ao aroma floral de cervejas comerciais. O linalol foi identificado, em estudo com CG/olfatometria, como o principal composto associado ao atributo “aroma lupulado” (STEINHAUS; FRITSCH; SCHIEBERLE, 2003). Outro estudo mostrou, através

de resultado de análise sensorial descritiva, que o linalol, o geraniol e o β -citronelol estão associados ao aroma frutado/cítrico de cervejas (TAKOI et al., 2010).

Os aldeídos presentes nos óleos essenciais também são importantes compostos de aroma provenientes do lúpulo, no estudo realizado por Steinhaus e Schieberle (2000), o hexenal foi caracterizado como um composto-chave, responsável pelo “aroma verde”.

O lúpulo também está associado à estabilidade do perfil aromático da cerveja, pois ele possui também compostos fenólicos, que são antioxidantes que reagem com radicais livres, mediadores ou inibidores enzimáticos e metais quelantes, preservando assim os compostos de aroma de reações de oxidação (SCHÖNBERGERAND; KOSTELECKY, 2011).

Durante a fervura do lúpulo em torno de 90% dos compostos voláteis do lúpulo são perdidos. Duas técnicas diferentes são empregadas para melhorar o perfil de aroma de lúpulo em cervejas uma delas, bastante difundida é a adição de parte do lúpulo próximo ao fim da fervura, técnica conhecida como *late hopping*, entretanto ainda ocorrem perdas de compostos voláteis. A outra técnica utilizada para compensar a perda de compostos de aroma durante a fervura é o *dry hopping* (HALEY; PEPPARD, 1983).

O *dry hopping* é a adição de lúpulo em cervejas após a fermentação principal. Essa técnica resulta em expressiva mudança no perfil aromático das cervejas, uma vez que durante a fervura ocorrem significativas perdas de compostos voláteis, a adição de lúpulo ao fim do processamento permite repor os compostos, sem modificar o amargor que é obtido pela fervura. Além disso, a técnica de *dry hopping* pode também aumentar a vida de prateleira de cervejas (KIPPENBERGER et al., 2014).

O *dry hopping* é uma técnica bastante difundida na produção artesanal de cervejas, entretanto, a literatura técnica e científica é bastante limitada.

3.4. Aplicação da enzima β -glicosidase em alimentos

As glicosidases são enzimas que catalisam a ruptura da ligação glicosídica em oligossacarídeos ou glico-conjugados. A especificidade de cada glicosidase é dependente do número, posição e configuração do grupo hidroxila na molécula. A enzima β -glicosidase atua na reação de ruptura da ligação β -1,4 de compostos glicosilados (MELO; GOMES; CARVALHO, 2006).

Os compostos de aroma estão presentes nas plantas na forma livre e/ou glicosilada. Na maioria das plantas, grande parte dos aromas encontram-se na forma glicosilada, sendo

encontrados em diferentes partes das plantas, como frutos, folhas, raízes, rizomas e sementes. Outros compostos do metabolismo das plantas como flavonóides, antocianinas e terpenóides são encontrados conjugados com açúcares nas plantas (AKACHA, GARGOURI, 2015).

A enzima β -glicosidase, vem sendo aplicada em bebidas, como chás, sucos de fruta e vinhos, melhorando a qualidade do perfil aromático destas bebidas (RAWAT; GULATI; JOSHI, 2011).

O trabalho realizado por Gonzalez-Pombo et al. (2011), mostrou que o tratamento enzimático em vinhos Moscato, aumentou as quantidades de monoterpenos e noroisoprenóides nos vinhos, indicando o potencial da aplicação para o desenvolvimento de aromas em vinhos. No estudo realizado por Wang et al. (2013), com a aplicação da enzima β -glicosidase em vinho tinto, a concentração de 19 dos 23 compostos de aroma identificados, aumentou significativamente.

Os compostos fenólicos, também se encontram sobre a forma glicosilada. A aplicação da enzima β -glicosidase em vinhos sicilianos resultou em um aumento de 75% na concentração de trans-resveratrol nos produtos (TODARO et al. 2008).

A enzima β -glicosidase é também utilizada para extração de aromas em chás. O estudo realizado por Su et al. (2010), mostrou que a aplicação de β -glicosidase em chás verde, vermelho e preto, aumentou a quantidade total de óleos essenciais presentes nos chás.

3.5. Identificação de compostos voláteis em bebidas

Para a identificação de compostos voláteis a metodologia utilizada é geralmente baseada na extração de óleos essenciais e a identificação desses compostos por cromatografia. As metodologias utilizadas diferenciam-se principalmente pelo método de extração. Entre os métodos de extração de óleos essenciais, a destilação é o mais conhecido, entretanto, esse método depende da utilização de solventes orgânicos, além de ser lento e ser passível de perdas de compostos voláteis durante o processo. Estima-se que 80% do tempo de análise consiste no tempo de preparo de amostra (VAS; VÉKEY, 2004).

A microextração em fase sólida é vantajosa, pois é considerada de simples operação, rápida, com alta sensibilidade e livre da utilização de solventes (PINHO; FERREIRA; SANTOS, 2006). O estudo realizado por Vázquez-Araújo et al. (2013), comparando os métodos de extração de hidro-destilação e a microextração em fase sólida em *headspace* (HSPME) em diferentes variedades de lúpulo, mostrou que a metodologia de HSPME é mais

rápida e com menores perdas, o que resulta em maior precisão na quantificação dos compostos.

A HSPME é um método de extração baseada no princípio de adsorção de compostos voláteis em uma fibra. A fibra é colocada em contato com *headspace* de um recipiente contendo a amostra, que submetida a aquecimento permite a volatilização de compostos de aroma que serão adsorvidos pela fibra, que poderá então ser diretamente injetada em um equipamento de Cromatografia Gasosa (CG), onde os compostos são dessorvidos pela alta temperatura (VALENTE; AUGUSTO, 2000). Na figura abaixo, é ilustrado o processo de adsorção e dessorção dos compostos voláteis nas fibras.

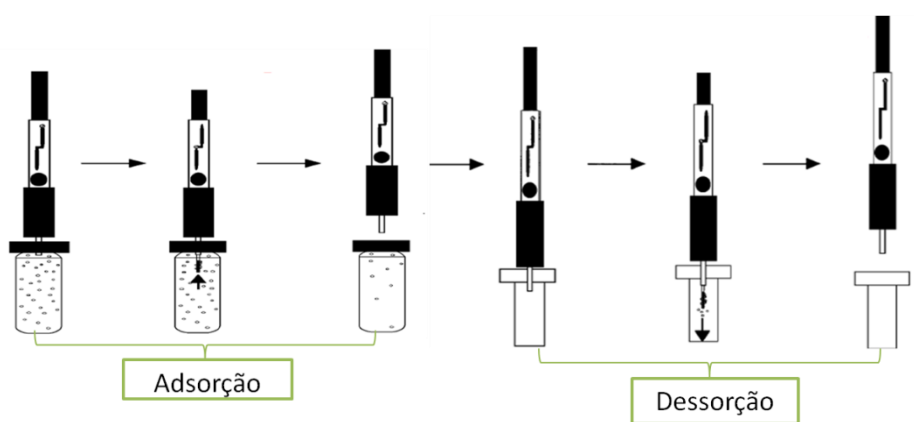


Figura 2 Adsorção e Dessorção de compostos voláteis em fibras de HSPME. Fonte: Supelco, 2001.

Atualmente são comercializados diferentes tipos de fibras, que possuem recheios, que funcionam como adsorventes, com diferentes polaridades, que, por sua vez, determinam o tipo de interação com os compostos. São comercializadas também fibras contendo misturas de dois ou três desses recheios, utilizadas principalmente quando não se conhece a composição da amostra, assim é possível com uma mesma fibra a identificação de grupos de compostos com características distintas. As fibras frequentemente utilizadas são a polidimetilsiloxano (PDMS), que é apolar fibra divinil benzeno estável (DVB), apolar, e a fibra de carboxen (CAR), carvão ativo microparticulado, sólido adsorvente. Também são comercializadas fibras com misturas destes recheios como CAR-PDMS, DVB-CAR-PDMS.

A eficiência e a sensibilidade da SPME podem ser melhoradas pela adição de um sal na amostra, como por exemplo, o cloreto de sódio. Isso ocorre devido ao efeito conhecido como “Salting out”: quando o sal é adicionado, a força iônica da solução aumenta e vários compostos tornam-se menos solúveis, o que contribui para o aumento da eficiência da extração de compostos voláteis (SCHUTTER et al., 2008).

A cromatografia compreende uma série de técnicas que têm em comum a separação de componentes pela interação diferencial dos compostos entre duas fases diferentes, uma estacionária com uma grande superfície e uma fase móvel, que contém a mistura. A cromatografia gasosa, operando em condições controladas, pode ser aplicada para separação e identificação (quando acoplada a um detector), de compostos em misturas na forma gasosa, na forma líquida, utilizando derivatização ou pirólise, e compostos voláteis (GROB; BARRY, 2004).

A cromatografia gasosa com identificação por espectro de massas (GCMS) é uma técnica comumente empregada para a identificação de compostos voláteis. A medida de índice de retenção (RI) dos compostos químicos e a comparação com dados de literatura é a técnica usual de confirmação de compostos identificados. Os dados de índice de retenção são importantes porque muitas vezes substituintes alquilas ramificados e isômeros trans/cis não apresentam espectros de massas diferentes (BABUSHOK; LINSTROM; ZENKEVICH, 2011).

O índice de Kovats, proposto por Kovats (1965), está baseado no fato de que as forças de interação entre compostos na fase gasosa são pouco relevantes em comparação as forças de interação entre os compostos e a coluna, com isso a variação de temperatura também é pouco importante dentro da faixa onde os compostos se mantêm na fase gás. Admitindo que a interação mais forte é entre o composto e a coluna e que esta interação entre os compostos e a coluna é linear, pode-se então estimar para a mesma coluna, em diferentes experimentos, um índice de retenção através da injeção de compostos conhecidos, atribuindo-se um índice aos mesmos. O índice de Kovats é calculado a partir de uma série de alcanos, para cada alcano o índice de kovatsé definido como o número de carbonos * 100, por exemplo, o índice doheptano (C_7H_{16}) é 700. O índice de Kovats dos compostos identificados é calculado fazendo uma interpolação linear com base no índice atribuído ao alcano, o tempo de retenção do alcano e o tempo de retenção do composto de interesse.

4. ARTIGO

A metodologia, os resultados e a discussão serão apresentados na forma de artigo. O artigo será submetido para publicação após tradução para o inglês e formatação de acordo com o periódico.

Perfil de compostos voláteis de mosto e cerveja com o uso da técnica de *dry hopping* e com a aplicação de β -glicosidase

Resumo

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo. O perfil aromático das cervejas é fortemente influenciado pela fermentação e pela lupulagem. O lúpulo confere à cerveja amargor, aroma e estabilidade. Entretanto a maior parte dos compostos de aroma é perdida durante a fervura, etapa indispensável para a liberação de compostos de amargor. A técnica de *dry hopping* consiste na adição de lúpulo à cerveja após a fermentação, com o objetivo de melhorar o perfil aromático do produto. A enzima β -glicosidase vêm sendo aplicada para a melhora do perfil aromático de sucos de fruta, vinho e chás, essa melhora é alcançada pois as plantas possuem compostos de aroma na forma glicosilada, o que os torna não voláteis, com a ação da enzima ocorre a ruptura da ligação glicosídica e os compostos se tornam voláteis. O objetivo deste estudo foi caracterizar o perfil aromático de cervejas com aplicação de *dry hopping* e da enzima β -glicosidase e avaliar a influência das duas técnicas no perfil de compostos. Foram identificados 21 compostos voláteis em mosto lupulado, dentre esses os compostos geraniol e terpeniol apresentaram aumento na concentração relativa com diferença estatisticamente significativa pela adição de β -glicosidase em mosto após a lupulagem. Na amostra de cerveja fermentada foram identificados 20 compostos voláteis, após a aplicação de *dry hopping*, o número de compostos identificados aumentou para 30. Na cerveja fermentada com aplicação de *dry hopping* e enzima β -glicosidase, a concentração relativa dos compostos mirceno e linalol aumentou após a aplicação enzimática. Os resultados indicam possível melhora do perfil aromático de cervejas tanto com aplicação de *dry hopping* quanto com a aplicação da enzima β -glicosidase.

Palavras-chave: Cerveja, β -glicosidases, *dry hopping*, HSPME-GCMS.

Introdução

A cerveja é uma bebida produzida e comercializada globalmente. Sendo também a bebida alcoólica mais consumida no mundo, estando incorporada à cultura da sociedade desde o início do domínio da agricultura (HORNSEY, 2016).

O lúpulo é um dos quatro ingredientes essenciais utilizados na produção de cerveja, conferindo ao produto sabor amargo, aroma, estabilidade da espuma e contribui para o aumento da vida de prateleira das cervejas. Durante a produção de cerveja o lúpulo é submetido ao processo de fervura onde ocorre a isomerização dos α -ácidos em iso- α -ácidos, que conferem amargor à cerveja (KEUKELEIRE, 1999).

Durante a fervura do lúpulo em torno de 90% dos compostos voláteis do lúpulo são perdidos. Duas técnicas diferentes são empregadas para melhorar o perfil de aroma de lúpulo em cervejas uma delas, bastante difundida é a adição de parte do lúpulo próximo ao fim da fervura, técnica conhecida como *late hopping*, entretanto ainda ocorrem perdas de compostos voláteis e também o processo de isomerização dos α -ácidos, aumentando o amargor. Outra técnica utilizada para compensar a perda de compostos de aroma durante a fervura é o *dry hopping* (HALEY; PEPPARD, 1983).

A técnica conhecida como *dry hopping* consiste na adição de lúpulo em cervejas após a fermentação principal. Isto resulta em expressiva mudança no perfil aromático das cervejas, uma vez que durante a fervura ocorrem significativas perdas de compostos voláteis, a adição de lúpulo ao fim do processamento permite repor os compostos, sem modificar o amargor que é obtido pela fervura (KIPPENBERGER et al., 2014).

Os compostos relacionados aos aromas das plantas apresentam-se, em parte, glicosilados, o que os torna não voláteis. A enzima β -glicosidases, de fonte exógena, vem sendo aplicada no processamento de sucos de frutas, vinhos e chás para liberação de compostos de voláteis e conseqüente melhora no perfil aromático desses produtos (AKACHA; GARGOURI, 2015).

A análise de compostos voláteis pela técnica de microextração em fase sólida em *headspace* acoplada a análise por cromatografia gasosa (HSPME-GCMS) é relatada como vantajosa, pois é considerada de simples operação, rápida, com alta sensibilidade e livre da utilização de solventes (PINHO; FERREIRA; SANTOS, 2006).

Assim o objetivo desse estudo foi avaliar o perfil de compostos voláteis por HSPME-GCMS de cervejas com aplicação da técnica de *dry hopping* e com a aplicação da enzima β -

glicosidase e a avaliação da contribuição das duas técnicas na modificação do perfil aromático de cervejas.

Materiais e Métodos

Atividade enzimática

A atividade de β -glicosidase da enzima comercial Lallzyme Beta (Scott Laboratories Inc, USA) foi determinada segundo a metodologia otimizada por Zaluski (2015). Foi utilizado *p*-nitrofenil- β -D-glicopiranosídeo, *p*-NPG, (SIGMA, St. Louis, MO, USA), como substrato. A mistura utilizada na reação continha 75 μ L de tampão citrato de sódio (pH 4,8, 0,1M), 100 μ L de *p*-NPG (4mg/mL) e 25 μ L da enzima livre diluída em tampão citrato de sódio (pH 4,8, 0,1M). A reação foi parada com a adição de tampão carbonato de sódio (pH 10, 0,1M). A concentração foi determinada pela medida da absorbância a 410nm em espectrofotômetro (modelo Ultrospec 3100 pro-UV/Visible, Amersham Pharmaciabiotec) do composto *p*-nitrofenil liberado. A concentração foi então calculada em relação a curva padrão de *p*-nitrofenil (Sigma, USA). Os resultados são expressos em unidades de atividade enzimática: uma unidade é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de *p*NP por minuto.

A atividade de β -glicosidase, nas condições ótimas, da enzima Lallzyme Beta utilizada nas aplicações foi 17000U. O valor elevado encontrado é compatível com um produto comercial uma vez que o preparado enzimático além de concentrado deve apresentar certo grau de purificação.

Aplicação da enzima β -glicosidase

A enzima Lallzyme Beta na concentração de 5g/hL foi aplicada em amostras de mosto após a lupulagem e em amostras de cerveja fermentada e de cerveja fermentada seguida da aplicação da técnica de *dry hopping*, obtidas da mesma batelada de cerveja tipo stout, contendo os lúpulos East Kent Golvings (6% a.a.; 3g/L) e Challenger (6% a.a.; 1,5g/L). As amostras com adição de enzima e as amostras de controle, mosto lupulado e cerveja fermentada, foram mantidas sob agitação, a 5°C, por 24 horas. Em seguida todas as amostras foram submetidas ao processo de sonicação utilizando banho de ultrassom (SCHOTT CT 52), por 10 minutos.

Dry hopping

No processo de *dry hopping* foi adicionado o lúpulo East Kent Golvings, na concentração de 20g/L, em duas amostras de 40 mL da cerveja fermentada e maturada. As amostras foram mantidas sob agitação por 24 horas, à 5°C, mesmas condições do tratamento enzimático, para eliminar possíveis efeitos durante a comparação. Em seguida todas as amostras foram submetidas ao processo de sonicação, para retirada completa de gás carbônico, por 10 minutos e congeladas para posterior análise por HSPME – GCMS.

Determinação de compostos voláteis por HSPME – GCMS

Preparo de amostra

As amostras foram centrifugadas (3000xg) durante 5 minutos, a 5°C. Em seguida foram adicionados 1 mL do sobrenadante em vials de 10mL para HSPME, contendo 0,3g de NaCl (P.A.), em triplicatas.

HSPME-GCMS

A microextração em fase sólida em *headspace* (HSPME) foi realizada utilizando a fibra DVB-CAR-PDMS (Supelco), à 55°C, por 45 minutos.

Após a extração a injeção, foi imediatamente realizada, injeção split, 250°C, 5min, em cromatógrafo gasoso (modelo GC-2010, SHIMADZU) acoplado a detector de massas (GCMS-QP2010, SHIMADZU). Foi utilizada coluna apolar com recheio DB-5.625 (Supelco) com dimensões 30mx0,25mmx0,25µm. Foi utilizado gás hélio como fase móvel, com fluxo 1mL/min. A temperatura foi mantida em 40°C por 5 minutos, com aquecimento 3°C/min até 200°C e 20°C/min até 250°C, mantida por 3 minutos. O detector foi mantido a 200°C, com espectro de massas m/z de 45 à 450.

Índice de Kovats

O índice de Kovats foi determinado, a partir da injeção da série padrão de alcanosem triplicata, mantendo-se os mesmos parâmetros de análise das amostras. Foram identificados os alcanos de 7 até 22 carbonos.

Concentração relativa

A concentração relativa ou área relativa (Equação 1) de um composto é determinada pela relação entre a área do pico do composto e a área total de picos do cromatograma (ZANBOM et al., 2012).

Equação 1 Concentração relativa de um composto

$$\text{Concentração relativa do composto \%} = \frac{\text{Área do composto}}{\text{Área total}}$$

Análises estatísticas

Foi realizada a análise de variância (ANOVA), fator único, $p < 0,05$, para comparação entre as áreas relativas dos compostos, foram comparadas as amostras MO e ME e as amostras FD e FE. A análise foi realizada utilizando o software Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft).

Resultados e discussão

Perfil aromático de mosto lupulado e mosto lupulado com aplicação de enzima

Foram identificados 21 compostos voláteis nas amostras de mosto. Na tabela 1 são apresentados os compostos identificados para as amostras de mosto lupulado (MO) e de mosto lupulado com adição de β -glicosidase (ME), o tempo de retenção, o índice de Kovats (experimental e teórico) e a área relativa.

Observando a tabela 1 percebe-se que o composto de maior concentração é o furfural, que é um dos compostos formados na Reação de Maillard, reação entre aminoácidos e açúcares redutores em altas temperaturas, que, neste caso, ocorre durante a etapa de torrefação do malte. Essa reação é favorável e contribui para a formação de cor e aroma característicos de produtos como o pão ou de outros produtos que passam pelo processo de torrefação, como o café (VAN BOEKEL, 2006).

Outro composto relacionado à reação de Maillard e ao processo de torrefação do malte é o 2-furanmetanol, esses dois compostos foram identificados por Yahya, Linforth e Cook (2014), por CG-MS, em cevada e malte torrados, sendo o furfural relacionado aos aromas de pão, de amêndoas doce, enquanto o furanmetanol está relacionado com aromas de pão, caramelizado e doce.

A formação de pirróis e piranonas, como a 1-(1H-pirrol-2-il)-Etanona também ocorre durante Reação de Maillard, os aromas são associados a queimado, pungente e caramelo, sendo relacionados ao café e produtos derivados de cereais(VAN BOEKEL, 2006).

Entre os compostos identificados nas amostras de mosto lupulado, o Linalol, o *trans*-geraniol, o α -terpineol e os mircenos estão associados ao lúpulo. O geraniol é associado ao aroma floral e aroma de rosas, o α -terpineol é associado aos aromas herbáceo e picante (TODARO et al., 2015).

O linalol está associado ao aroma floral e foi relatado, em estudo com CG/olfatometria, como o principal composto associado ao atributo “aroma lupulado” (STEINHAUS; FRITSCH; SCHIEBERLE, 2003).

Tabela 1 Compostos identificados por HSPME-GMCS, tempo de retenção (RT), índice de retenção (IR) e concentração relativa, das amostras mosto lupulado (MO) e demosto lupulado com adição de β -glicosidase (ME)

Composto	RT		IR (Calculado)		IR(Literatura)		A%**	
	MO	ME	MO	ME	IR	REFERÊNCIA *	MO	ME
1-pentanol	3,746	3,754	759	758	762	[1]	0,38	0,38
Hexanal	5,698	5,709	801	801	801	[1]	0,47	0,50
Furfural	6,985	6,997	829	830	828	[1]	58,84	60,93
2-Furanmetanol	8,067	8,083	853	853	856	[1]	3,21	3,47
1-Hexanol	8,811	8,823	869	870	863	[1]	0,59	0,63
2-metil-, Propanoato de butila	16,362	16,377	1016	1016	1020	[4]	1,89	1,98
Benzeno acetaldéido	17,690	17,703	1041	1041	1036	[1]	6,42	6,58
1-(1H-pirrol-2-il)-Etanona	18,958	18,975	1065	1066	1060	[4]	0,71	0,63
Linalol	20,721	20,735	1099	1099	1095	[1]	5,50	5,72
Maltol	21,132	21,158	1107	1107	1006	[1]	0,96	0,87
Fenil etanol	21,239	21,252	1109	1109	1110	[3]	6,45	5,18
α -terpineol	25,400	25,413	1192	1192	1185	[3]	1,01 ^b	1,10 ^a
<i>trans</i> -geraniol	28,140	28,151	1250	1250	1249	[1]	0,48 ^b	0,56 ^a
Ácido nonanóico	29,300	29,300	1274	1274	1267	[1]	2,59	2,57
2-Undecanona	30,119	30,131	1292	1292	1293	[1]	0,85	0,86
Cariofileno	35,473	35,486	1413	1413	1417	[1]	1,26 ^a	0,87 ^b
α -Cariofileno	36,992	37,004	1449	1449	1444	[3]	5,69 ^a	4,24 ^b
1-Dodecanol	38,035	38,046	1474	1474	1470	[2]	0,35	0,56
2-Tridecanona	38,861	38,874	1494	1494	1495	[1]	0,37	0,35
Óxido de cariofileno	42,089	42,102	1575	1575	1573	[3]	0,45 ^a	0,41 ^b
Hexadecanoato de metila	54,466	54,604	1920	1925	1921	[1]	1,18	1,39

* [1] Adams (2007); [2] The LRI and odour data base; [3] The phero base; [4] National institute of Standards and Technology. ** Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

A Figura 1 mostra as médias e desvios padrão encontrados para o β -linalol, o trans-geraniol, o α -terpineol.

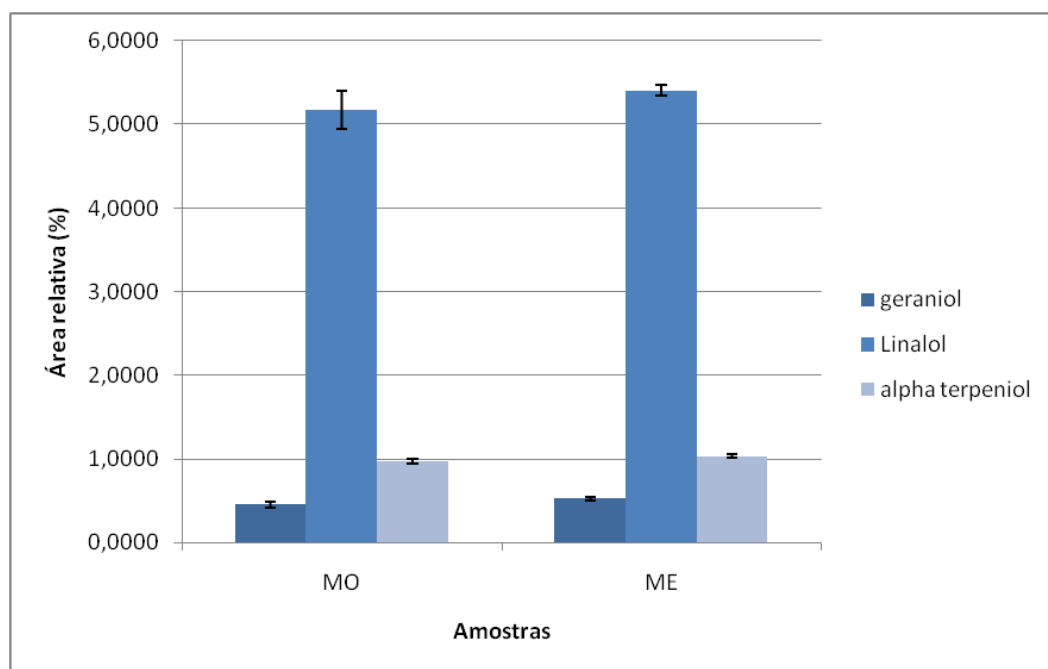


Figura 3 Médias e desvios padrão da área relativa dos compostos geraniol, linalol e alpha terpineol encontrados na amostras de mosto lupulado (MO) e mosto lupulado com adição de β -glicosidase (ME).

Na figura 1 observa-se que as áreas relativas dos três compostos aumentaram após o tratamento enzimático. Esses resultados estão de acordo com trabalho realizado por Wang et al. (2013), que teve como resultado, após a aplicação de β -glicosidase em vinhos, aumento da concentração de quatro terpenos, entre eles o linalol e o terpineol. No estudo realizado por Daenen et al. (2007), realizado com extrato glicosilado de lúpulo e leveduras com atividade de glicosidase, foi identificada a liberação de linalol pela ação das leveduras.

Na tabela 1, supracitada, observa-se que a área relativa dos picos dos compostos trans-geraniol e α -terpineol aumentaram significativamente com o tratamento enzimático. Esses resultados estão de acordo com o estudo realizado por Cabaroglu et al. (2003), que aplicando β -glicosidases em vinhos, observaram que o tratamento enzimático aumentou a concentração de alpha-terpineol e geraniol, com diferença estatisticamente significativa.

Perfil aromático de cerveja fermentada, cerveja fermentada com *dry hopping* e cerveja fermentada com *dry hopping* e aplicação de enzima β -glicosidase

Na amostra controle de cerveja fermentada (FO), foram identificados 20 compostos (Tabela 2). Observa-se que os compostos originados pela reação de Maillard, majoritários na amostra de mosto, não foram identificados na amostra FO. A resistência de leveduras que crescem em presença de furfural e a degradação de compostos semelhantes como o hidroximetilfurfural já foram relatadas na literatura previamente (LIU et al., 2004; AKILLIOGLU; MOGOL; GÖKMEN, 2011)

O composto de maior área relativa na amostra FO é o fenil etanol (77,68%). Também pode ser observada a presença de um éster formado a partir do mesmo álcool, o fenil acetato. O fenil etanol e o fenil acetato são produzidos pelas leveduras durante a fermentação e são sensorialmente associados ao aroma de rosas (FUKUDA et al., 1990).

Observa-se também na tabela 2, que a maioria dos compostos formados durante a fermentação são ésteres. Os ésteres são formados no interior da célula da levedura durante a fermentação e como são solúveis passam da membrana para o meio. Apesar de presentes em quantidades traço em bebidas como a cerveja e o vinho, são fundamentais para a formação do aroma destas bebidas, o qual se caracterizará em função dos tipos de ésteres e das quantidades presentes. Os ésteres são associados ao aroma frutado (VERSTREPEN, et al. 2003).

Na Tabela 3, são apresentados os 30 compostos identificados para a amostra de cerveja fermentada após a aplicação de *dry hopping* (FD) e com aplicação de *dry hopping* e enzima β -glicosidase (FDE).

Comparando os compostos das amostras FD (Tabela 3) e FO (Tabela 2), observa-se que 10 compostos que não estavam presentes na amostra FO, foram identificados após o emprego da técnica de *dry hopping*. Entre os compostos associados ao *dry hopping* foram identificados compostos comumente presentes em lúpulo como o mirceno, o trans-geraniol, o metil geranato, o cadinol e o óxido de cariofileno. Foram identificados também ésteres e cetonas.

O geraniol, associado ao aroma floral, é citado em diversos estudos como um dos principais compostos de aroma de lúpulo, sua concentração é dependente do cultivar de lúpulo utilizado (TAKOI et al., 2010).

Os cariofilenos, tanto na forma hidratada quanto na forma oxidada, estão entre os compostos geralmente identificados como majoritários em lúpulo e são classificados também como um dos sesquiterpenos mais encontrados na natureza. Entretanto, após a etapa de fervura no processamento de cervejas, resta apenas uma pequena fração do composto no produto (STEENACKERS; COOMAN; VOS; 2015).

Tabela 2 Compostos voláteis identificados por HSPME-GMCS, tempo de retenção (RT), índice de retenção (IR) e concentração relativa, na amostra de cerveja fermentada (FO)

Composto	RT	IR (Calculado)	IR (Literatura)		Área%
			IR	REFERÊNCIA*	
1-Pentanol	3,747	758	762	[1]	9,95
Butanoato de etila	5,752	802	802	[1]	0,09
3-Metil, Acetato de butila	9,104	876	875	[1]	1,41
Estireno	9,610	887	889	[2]	0,33
Hexadecanoato de etila	15,540	1001	997	[1]	2,04
2- Metil, Propanoato de butila	16,357	1016	1020	[4]	0,05
1-Octanol	19,327	1072	1072	[2]	0,16
Linalol	20,719	1099	1095	[1]	0,70
Fenil-etanol	21,490	1114	1110	[3]	77,68
Citronelol	27,051	1227	1223	[1]	0,14
Acetato de feniletila	28,065	1248	1254	[1]	4,41
Ácido nonanóico	29,288	1274	1267	[1]	0,28
Ácido n-decanóico	33,690	1372	1364	[1]	0,77
Cariofileno	35,471	1412	1417	[1]	0,07
α -cariofileno	36,986	1449	1444	[3]	0,28
Dodecanol	38,048	1474	1470	[2]	0,21
Dodecanoato de etila	42,807	1593	1395	[1]	0,35
Tetradecanoato de etila	50,134	1793	1725	[1]	0,07
Hexadecanoato de metila	54,588	1924	1921	[1]	0,25
Hexadecanoato de etila	56,803	1992	1992	[1]	0,20

* [1] Adams (2007); [2] The LRI and odour data base; [3] The phero base; [4] National institute of Standards and Technology.

Tabela 3 Compostos voláteis identificados por HSPME-GMCS, tempo de retenção (RT), índice de retenção (IR) e concentração relativa, nas amostras de cerveja fermentada com aplicação de dry hopping (FD) e de cerveja fermentada com aplicação de dry hopping e com adição de β -glicosidase (FE)

Composto	RT		IR (Calculado)		IR (Literatura)		A%**	
	FD	FE	FD	FE	IR	REFERÊNCIA*	FD	FE
1-Pentanol	3,732	3,743	758	758	762	[1]	9,84	9,80
Butanoato de etila	5,737	5,738	802	802	802	[1]	0,09b	0,12a
13-Metil, Acetato de butila	9,091	9,099	875	876	875	[1]	1,17	1,63
Estireno	9,597	9,604	887	887	889	[2]	0,21	0,26
Propanoato de pentila	14,020	14,023	972	972	972	[2]	0,15b	0,22a
Mirceno	14,856	14,867	987	988	988	[1]	1,16b	1,73a
Hexanoato de etila	15,480	15,489	999	1000	997	[1]	0,86b	1,64a
2- Metil, Propanoato de butila	17,336	16,357	1035	1016	1020	[4]	0,37b	0,76a
1-Octanol	19,777	19,316	1081	1072	1072	[2]	0,18b	0,19a
Linalol	20,967	20,717	1103	1099	1095	[1]	1,94b	2,31a
Fenil-etanol	22,819	21,417	1140	1113	1110	[3]	69,78	68,76
β -citronelol	27,422	27,064	1235	1227	1223	[1]	0,11	0,12
<i>trans</i> -geraniol	28,181	28,154	1251	1250	1249	[1]	0,18	0,22
Acetato de feniletila	28,481	28,258	1257	1252	1254	[1]	3,39	3,26
5-Decen-1-ol	29,064	28,941	1269	1267	1268	[1]	0,10	0,12
Ácido nonanóico	29,577	29,312	1280	1275	1267	[1]	0,51	0,50
2-Undecanona	30,529	30,038	1300	1290	1293	[1]	0,48	0,54
Metilgeranato	32,141	31,379	1337	1319	1223	[1]	0,20b	0,22a
Ácido n-decanóico	33,893	33,683	1376	1372	1364	[1]	0,46	0,40

Decenoato de etila	34,445	34,280	1389	1385	1390	[2]	1,52	1,32
Cariofileno	35,966	35,209	1412	1406	1417	[1]	0,76	0,59
α -Cariofileno	37,331	36,990	1449	1449	1444	[3]	3,60	3,21
1-Dodecanol	38,304	38,036	1474	1474	1470	[2]	0,09	0,11
2-Tridecanona	38,732	38,856	1491	1494	1495	[1]	0,11	0,11
Decanoato de etila	42,096	42,103	1575	1575	1595	[1]	0,08	0,08
Óxido de cariofileno	42,794	42,790	1593	1593	1395	[1]	0,27	0,19
α -Cadinol	44,928	44,939	1649	1650	1644	[2]	0,23	0,23
Tetradecanoato de etila	50,124	50,132	1792	1792	1725	[1]	0,07	0,06
Hexadecanoato de metila	54,577	54,585	1924	1924	1921	[1]	0,14b	0,28a
Hexadecanoato de etila	56,792	56,800	1992	1992	1992	[1]	0,31	0,30

* [1] Adams (2007); [2] The LRI and odour data base; [3] The phero base; [4] National institute of Standards and Technology. ** Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as amostras ($p < 0,05$).

O mirceno, que foi identificado após o *dry hopping*, pode ser associado à adição de lúpulo uma vez que é um composto volátil identificado na maioria dos estudos sobre compostos voláteis de lúpulo. Além disso, é relatado como um dos compostos majoritários no óleo essencial de lúpulo. Esse composto está associado sensorialmente ao aroma herbáceo (GONÇALVES, et al. 2012).

O cadinol também foi identificado por HSPME-GCMS por van Opstaele et al. (2012), que estudaram compostos presentes em óleo essencial de flor de lúpulo. No mesmo estudo, foram identificados também alguns ésteres e cetonas, como a undecanona e a tridecanona, que no presente trabalho também foram identificadas após a aplicação de *dry hopping*.

A amostra com aplicação de enzima β -glicosidase apresentou maiores valores para os compostos mirceno e linalol (Figura 3), indicando possível ação da enzima sobre os compostos na forma glicosilada. Observa-se também que o mirceno, relatado como um dos compostos majoritários na maioria dos estudos com lúpulo (SCHÖNBERGER; KOSTELECKY, 2011), não estava presente na amostra sem *dry hopping*, indicando a possível perda desse composto durante a fervura.

Além disso, em estudo realizado por Steinhaus e Schieberle (2000), que analisaram os aromas de lúpulo fresco e seco, por CG-olfatometria, o linalol e o mirceno são considerados os mais importantes aromatizantes encontrados nas amostras, junto ao trans-4,5-epoxy-(E)-2-decenal.

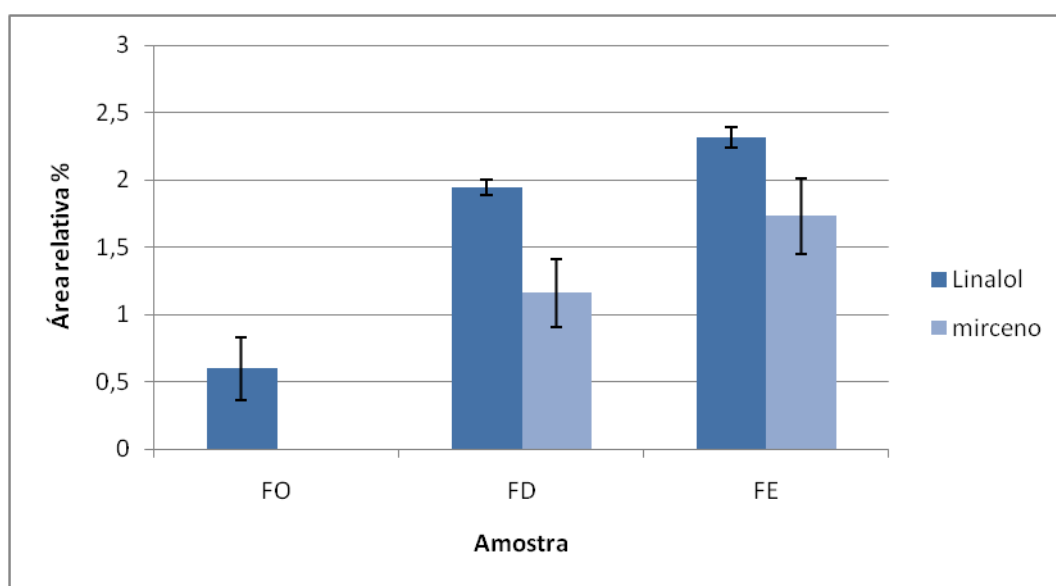


Figura 4. Área relativa (%) dos compostos mirceno e linalol nas amostras FO, FD e FE

Observa-se também que alguns ésteres possuem quantidades diferentes nas amostras FD e FDE, no entanto, não é possível atribuir este aumento a ação da B-glicosidases, embora a presença de contaminação por outras enzimas como lípases no preparado enzimático não possa ser descartada e por consequência a síntese de ésteres a partir de precursores desta amostra também pode ser uma possibilidade. Porém, esta análise deve ser feita utilizando um método mais preciso para quantificação dos compostos menos voláteis, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de modo a confirmar os resultados obtidos por HSPME-GC-MS.

Conclusão

Com a aplicação de *dry hopping* foi possível identificar aumento no número de compostos voláteis. Foram identificados 10 compostos que não estavam presentes na amostra de cerveja fermentada sem aplicação de *dry hopping*, entre os compostos que foram identificados estão terpenos, ésteres e cetonas. Assim, esta técnica que vem sendo usada como forma de melhorar o perfil aromático de cervejas, é respaldada pelos resultados aqui relatados.

Na amostra de mosto lupulado foi identificado o aumento da concentração relativa dos compostos geraniol e α -terpeniol. Já na amostra de cerveja fermentada com aplicação de *dry hopping* e enzima β -glicosidase, a concentração relativa dos compostos mirceno e linalol aumentou, demonstrando que possivelmente a enzima atua liberando esses compostos, contribuindo para o perfil aromático das cervejas.

Referências Bibliográficas

AKACHA, Najla Ben; GARGOURI, Mohamed. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food And Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 94, p.675-706, abr. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.09.011. Disponível em:<<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0960308514001199?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

AKILLIOGLU, Halise Gül; MOGOL, Burçe Ataç; GÖKMEN, Vural. Degradation of 5-hydroxymethylfurfural during yeast fermentation. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [s.l.], p.1-7, 4 ago. 2011. Informa UK Limited. DOI: 10.1080/19440049.2011.609491.

DAENEN, L. et al. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *J Appl Microbiol*, [s.l.], p.478-488, 10 out. 2007. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03566.x. Disponível em:

<<http://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1111/j.1365-2672.2007.03566.x>>.
Acessoem: 03 nov. 2015.

FUKUDA, Kazuro et al. Breeding of Brewing Yeast Producing a Large Amount of β -Phenylethyl Alcohol and β -Phenylethyl Acetate. *Agricultural And Biological Chemistry*, [s.l.], v. 54, n. 1, p.269-271, jan. 1990. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00021369.1990.10869930>>. Acesso em: 05 nov. 2015.

GONÇALVES, João et al. Headspace solid-phase microextraction combined with mass spectrometry as a powerful analytical tool for profiling the terpenoidmetabolomic pattern of hop-essential oil derived from Saaz variety. **J. Sep. Science**, [s.l.], v. 35, n. 17, p.2282-2296, 17 jul. 2012. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/jssc.201200244. Disponível em: <<http://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1002/jssc.201200244>>. Acessoem: 08 nov. 2015.

HORNSEY, I.s.. Beer: History and Types. **Encyclopedia of Food And Health**, [s.l.], p.345-354, 2016. Elsevier BV. DOI: 10.1016/b978-0-12-384947-2.00057-x. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:B978012384947200057X?httpAccept=text/xml>>. Acessoem: 22 nov. 2015.

KEUKELEIRE, Denis de. FUNDAMENTALS OF BEER AND HOP CHEMISTRY. *Química Nova*, [s.l.], v. 23, n. 1, p.108-112, jan. 2000.

KIPPENBERGER, M. et al. Transfer of Nitrate and various Pesticides into Beer during Dry Hopping. *Brewingscience*, Mainburg, v. 67, n. /, p.1-9, fev. 2014. Disponível em: <http://www.hopsteiner.de/fileadmin/redeakteur/pdf/neuigkeiten-berichte/technische-veroeffentlichungen_NEU/2014/Transfer_of_Nitrate_and_various_Pesticides_into_Beer_during_Dry_Hopping_M_Kippensberger_S_Hanke_M_Biendl_G_Stettner_A_Lagemann_-_BS_2014.pdf>. Acessoem: 31 out. 2015.

LIU, Z. L. et al. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **J Ind Microbiol Biotechnol**, [s.l.], v. 31, n. 8, p.345-352, 29 jul. 2004. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s10295-004-0148-3.

PINHO, Olivia; FERREIRA, Isabel M.p.l.v.o.; SANTOS, LúciaH.m.l.m..Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1121, n. 2, p.145-153, jul. 2006. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.04.013. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0021967306008314?httpAccept=text/xml>>. Acessoem: 31 out. 2015.

SCHÖNBERGER, C.; KOSTELECKY, T.. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. **J. Inst. Brew**, [s.l.], v. 117, n. 3, p.259-267, mar. 2011.

STEENACKERS, Bart; COOMAN, Luc de; VOS, Dirk de. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 172, p.742-756, abr. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.139. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0308814614015258?httpAccept=text/xml>>. Acessoem: 04 out. 2015.

STEINHAUS, Martin; SCHIEBERLE, Peter. Comparison of the Most Odor-Active Compounds in Fresh and Dried Hop Cones (*Humulus lupulus* L. Variety Spalter Select)

Based on GC–Olfactometry and Odor Dilution Techniques. **J. Agric. Food Chem.**, [s.l.], v. 48, n. 5, p.1776-1783, maio 2000. American Chemical Society (ACS). DOI: 10.1021/jf990514l.

TAKOI, Kiyoshi et al. The Contribution of Geraniol Metabolism to the Citrus Flavour of Beer: Synergy of Geraniol and β -Citronellol Under Coexistence with Excess Linalool. **J. Inst. Brew**, S.l., v. 3, n. 116, p.251-260, mar. 2010.

VAN BOEKEL, M.a.j.s.. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, [s.l.], v. 24, n. 2, p.230-233, mar. 2006. Elsevier BV. DOI:10.1016/j.biotechadv.2005.11.004. Disponível em;

<<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S073497500500145X?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 03 nov. 2015.

VAN OPSTAELE, Filip et al. Characterization of Novel Varietal Floral Hop Aromas by Headspace Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry/Olfactometry. **J. Agric. Food Chem.**, [s.l.], v. 60, n. 50, p.12270-12281, 19 dez. 2012. American Chemical Society (ACS). DOI: 10.1021/jf304421d.

VERSTREPEN, Kevin J. et al. Flavor Active- Sters: Adding Fruitiness to Beer. **Journal Of Bioscience And Ingennering**, [S.l.], v. 96, n. 2, p.110-118, dez. 2003. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1389172303901125/1-s2.0-S1389172303901125-main.pdf?_tid=f8cdd010-802d-11e5-b9100000aab0f02&acdnat=1446337244_ef7fd036b022a7f4062a22729ce4c9b3>. Acesso em: 31 out. 2015.

WELKE, Juliane E. et al. Volatile Characterization by Multivariate Optimization of Headspace-Solid Phase Microextraction and Sensorial Evaluation of Chardonnay Base Wines. **J. Braz. Chem. Soc.**, S.l., v. 23, n. 5, p.678-687, abr. 2012.

YAHYA, Hafiza; LINFORTH, Robert S.t.; COOK, David J..Flavour generation during commercial barley and malt roasting operations: A time course study. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 145, p.378-387, fev. 2014. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.08.046. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0308814613011187?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 03 nov. 2015

ZALUSKI, Franciele. **Imobilização de β -glicosidase em quitosana e aplicação visando a melhora do perfil aromático de vinhos**. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

ZAMBON, E.R.C.S. et al. Study of the Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography, Gas Chromatography in PlantScience, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications. Dr. BekirSalih (Ed.), (2012).ISBN: 978-953-51-0127-7, InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/gas-chromatography-in-plant-sciencewine-technology-toxicology-and-some-specific-applications/study-of-the-chemical-composition-of-essentialoils>. Acesso em 04 nov. 2015

5. CONCLUSÃO GERAL

Foi possível identificar entre 20 e 30 compostos voláteis nas amostras analisadas, com diferentes perfis para diferentes amostras. Mostrando que a metodologia de extração por HSPME-GCMS pode ser aplicada a análise de cervejas.

Nas amostras de mosto os compostos predominantes eram os compostos da reação de maillard e compostos presentes em óleo essencial de lúpulo. Já na amostra de cerveja fermentada, foi predominante a presença de ésteres, alcoóis e compostos de lúpulo.

Quando foi adicionado o lúpulo pela utilização da técnica de *dry hopping* foi possível identificar 10 compostos voláteis, além dos voláteis já presentes na amostra controle, entre os compostos identificados após a aplicação de *dry hopping* encontram-se terpenos, cetonas e ésteres, confirmando que o emprego da técnica altera o perfil aromático de cervejas.

Com a aplicação da enzima β -glicosidase, houve aumento de geraniol e α -terpeniol na amostra de mosto lupulado e de linalol e mirceno na amostra de cerveja após a aplicação de *dry hopping*, indicando a possível ação da enzima sobre a liberação desses compostos.

Embora outros estudos devam ser realizados para a comprovação desses resultados, bem como a otimização da metodologia de análise e das condições da aplicação da enzima, neste trabalho, foi possível verificar que tanto a aplicação de β -glicosidase, quanto o uso da técnica de *dry hopping*, apresentam influencia na modificação do perfil de voláteis de cerveja. Se por um lado a aplicação de β -glicosidase é algo novo e deve ser melhor avaliado quanto a sua possível intervenção na melhora do perfil aromático de cerveja, por outro, a técnica de *dry hopping* é amplamente utilizada e associada a um aumento na intensidade do aroma lupulado. Neste último caso, os resultados aqui apresentados confirmam a modificação no perfil de compostos voláteis após a aplicação desta técnica, comprovando cientificamente aquilo que já era observado na prática pelos cervejeiros.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.p.. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.

AKACHA, Najla Ben; GARGOURI, Mohamed. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: Synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. **Food And Bioproducts Processing**, [s.l.], v. 94, p.675-706, abr. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.09.011. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0960308514001199?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

AKILLIOGLU, Halise Gül; MOGOL, Burçe Ataç; GÖKMEN, Vural. Degradation of 5-hydroxymethylfurfural during yeast fermentation. **Food Additives & Contaminants: Part A**, [s.l.], p.1-7, 4 ago. 2011. Informa UK Limited. DOI: 10.1080/19440049.2011.609491.

BABUSHOK, V. I.; LINSTROM, P. J.; ZENKEVICH, I. G.. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. *Journal Of Physical And Chemical Reference Data*, [s.l.], v. 40, n. 4, p.01-47, 2011. AIP Publishing. DOI: 10.1063/1.3653552.

BAXTER, E. Denise; HUGHES, Paul S.. **Beer : Quality, Safety and Nutritional Aspects**. New York: Springer VerlagNy, 2001. 139 p.

BORGES, Pedro Felipe Oliveira. **Concentração do mercado de cerveja no brasil e a participação das microcervejarias**. 2015. 72 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2015.

BRASIL. Decreto nº 6871, de 04 de junho de 2009. **Decreto Nº 6.871, de 4 de Junho de 2009**. Brasil

CABAROGLU, Turgut et al. Wine flavor enhancement through the use of exogenous fungal glycosidases. **Enzyme And Microbial Technology**, [s.l.], v. 33, n. 5, p.581-587, out. 2003. Elsevier BV. DOI: 10.1016/s0141-0229(03)00179-0. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0141022903001790?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 03 nov. 2015.

DAENEN, L. et al. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. **J Appl Microbiol**, [s.l.], p.478-488, 10 out. 2007. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2007.03566.x. Disponível em: <<http://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1111/j.1365-2672.2007.03566.x>>. Acesso em: 03 nov. 2015.

DRAGONE, G.; SILVA, J.B.A. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W.G. *Bebidas Alcolólicas: Ciência e Tecnologia* – São Paulo: Editora Bluncher. 2010. Volume 1. 15-50.

KOVATS, E.S. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index. 1965 in: This week citation classic. **Advan, Cromatography**. April, 1988.

FERNANDES, Pedro. Enzymes in Food Processing: A Condensed Overview on Strategies for Better Biocatalysts. *Enzyme Research*, [s.l.], v. 2010, p.1-19, 2010. Hindawi Publishing Corporation. DOI: 10.4061/2010/862537. Disponível em: <<http://downloads.hindawi.com/journals/er/2010/862537.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

FUKUDA, Kazuro et al. Breeding of Brewing Yeast Producing a Large Amount of β -Phenylethyl Alcohol and β -Phenylethyl Acetate. *Agricultural And Biological Chemistry*, [s.l.], v. 54, n. 1, p.269-271, jan. 1990. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/00021369.1990.10869930>>. Acesso em: 05 nov. 2015.

GONZÁLEZ-POMBO, Paula et al. A novel extracellular β -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochemistry*, [s.l.], v. 46, n. 1, p.385-389, jan. 2011. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.07.016. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S1359511310002813?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

GROB, Robert L.; BARRY, Eugene F.. **Modern Practice of Gas Chromatography**. 4. ed. S.l: Wiley Interscience, 2004. 1064 p.

HALEY, J.; PEPPARD, T. L.. Differences in utilisation of the essential oil of hops during the production of dry-hopped and late-hopped beers. *J. Inst. Brew...*, [s.l.], v. 89, n. 2, p.87-91, mar. 1983.

HORNSEY, Ian S.. Brewing: Hops. **Rsc Paperbacks**, [s.l.], p.58-84, 2007. Royal Society of Chemistry (RSC). DOI: 10.1039/9781847550286-00058.

HORNSEY, I.s.. Beer: History and Types. **Encyclopedia of Food And Health**, [s.l.], p.345-354, 2016. Elsevier BV. DOI: 10.1016/b978-0-12-384947-2.00057-x. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:B978012384947200057X?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 22 nov. 2015.

GONÇALVES, João et al. Headspace solid-phase microextraction combined with mass spectrometry as a powerful analytical tool for profiling the terpenoid metabolomic pattern of hop-essential oil derived from Saaz variety. *J. Sep. Science*, [s.l.], v. 35, n. 17, p.2282-2296, 17 jul. 2012. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/jssc.201200244. Disponível em: <<http://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1002/jssc.201200244>>. Acesso em: 08 nov. 2015.

KEUKELEIRE, Denis de. **FUNDAMENTALS OF BEER AND HOP CHEMISTRY**. *Química Nova*, [s.l.], v. 23, n. 1, p.108-112, jan. 2000.

KIPPENBERGER, M. et al. Transfer of Nitrate and various Pesticides into Beer during Dry Hopping. *Brewingscience*, Mainburg, v. 67, n. /, p.1-9, fev. 2014. Disponível em: <http://www.hopsteiner.de/fileadmin/redeakteur/pdf/neuigkeiten-berichte/technische-veroeffentlichungen_NEU/2014/Transfer_of_Nitrate_and_various_Pesticides_into_Beer_during_Dry_Hopping_M._Kippensberger_S._Hanke_M._Biendl_G._Stettner_A._Lagemann_-_BS_2014.pdf>. Acesso em: 31 out. 2015.

LIGOR, Magdalena et al. Comparative Gas Chromatographic–Mass Spectrometric Evaluation of Hop (*Humulus lupulus* L.) Essential Oils and Extracts Obtained Using Different Sample Preparation Methods. *Food Analytical Methods*, [s.l.], v. 7, n. 7, p.1433-1442, 11 dez. 2013. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s12161-013-9767-5.

LIU, Z. L. et al. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J Ind Microbiol Biotechnol*, [s.l.], v. 31, n. 8, p.345-352, 29 jul. 2004. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s10295-004-0148-3.

MELO, Eduardo Borges de; GOMES, Adriane da Silveira; CARVALHO, Ivone. α - and β -Glucosidase inhibitors: chemical structure and biological activity. *Tetrahedron*, [s.l.], v. 62, n. 44, p.10277-10302, out. 2006. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.tet.2006.08.055. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0040402006013421?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

MOLL, M. Bières & Coolers: Définition, fabrication et composition. Paris. Tec&Doc-Lavoisier. 1991. 516p.

PEACOCK, Val E. et al. Floral hop aroma in beer. *J. Agric. Food Chem.*, [s.l.], v. 29, n. 6, p.1265-1269, nov. 1981. American Chemical Society (ACS). DOI: 10.1021/jf00108a041.

PINHO, Olivia; FERREIRA, Isabel M.p.l.v.o.; SANTOS, Lúcia H.m.l.m. Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1121, n. 2, p.145-153, jul. 2006. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.04.013. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0021967306008314?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 31 out. 2015.

RAWAT, Renu; GULATI, Ashu; JOSHI, Robin. PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF β -GLUCOSIDASE FROM TEA SHOOT. *Journal Of Food Biochemistry*, [s.l.], v. 35, n. 3, p.953-975, jun. 2011. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2010.00422.x. Disponível em: <<http://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1111/j.1745-4514.2010.00422.x>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

SCHÖNBERGER, C.; KOSTELECKY, T.. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. **J. Inst. Brew**, [s.l.], v. 117, n. 3, p.259-267, mar. 2011.

SCHUTTER, David P. de et al. Optimisation of wort volatile analysis by headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**, [s.l.], v. 1179, n. 2, p.75-80, fev. 2008. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.11.103. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0021967307020808?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 31 out. 2015.

SILVA, J.B.A. Cerveja. In: Venturini Filho, W.G. Tecnologia de bebidas: Matéria Prima, Processamento, BPF/APPCC, Legislação, Mercado. São Paulo: Editora Edgar Bluncher Ltda. 2005. p. 347-382.

STEENACKERS, Bart; COOMAN, Luc de; VOS, Dirk de. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 172, p.742-756, abr. 2015. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.139. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0308814614015258?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 04 out. 2015.

STEINHAUS, Martin; FRITSCH, Helge T.; SCHIEBERLE, Peter. Quantitation of (R)- and (S)-Linalool in Beer Using Solid Phase Microextraction (SPME) in Combination with a Stable Isotope Dilution Assay (SIDA). *J. Agric. Food Chem.*, [s.l.], v. 51, n. 24, p.7100-7105, nov. 2003. American Chemical Society (ACS). DOI: 10.1021/jf0347057.

STEINHAUS, Martin; SCHIEBERLE, Peter. Comparison of the Most Odor-Active Compounds in Fresh and Dried Hop Cones (*Humulus lupulus* L. Variety Spalter Select) Based on GC-Olfactometry and Odor Dilution Techniques. *J. Agric. Food Chem.*, [s.l.], v.

48, n. 5, p.1776-1783, maio 2000. American Chemical Society (ACS). DOI: 10.1021/jf990514l.

SU, Erzhang et al. Immobilization of β -glucosidase and its aroma-increasing effect on tea beverage. *Food And Bioproducts Processing*, [s.l.], v. 88, n. 2-3, p.83-89, jun. 2010. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.fbp.2009.04.001. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0960308509000224?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

TAKOI, Kiyoshi et al. Biotransformation of Hop-Derived Monoterpene Alcohols by Lager Yeast and Their Contribution to the Flavor of Hopped Beer. *J. Agric. Food Chem.*, [s.l.], v. 58, n. 8, p.5050-5058, 28 abr. 2010. American Chemical Society (ACS). DOI: 10.1021/jf1000524.

TAKOI, Kiyoshi et al. The Contribution of Geraniol Metabolism to the Citrus Flavour of Beer: Synergy of Geraniol and β -Citronellol Under Coexistence with Excess Linalool. **J. Inst. Brew**, S.l., v. 3, n. 116, p.251-260, mar. 2010.

TANIGUCHI, Yoshimasa et al. Identification and Quantification of the Oxidation Products Derived from α -Acids and β -Acids During Storage of Hops (*Humulus lupulus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, [s.l.], v. 61, n. 12, p.3121-3130, 27 mar. 2013. American Chemical Society (ACS). DOI: 10.1021/jf3047187.

TODARO, Aldo et al. Increase of trans-resveratrol in typical Sicilian wine using β -Glucosidase from various sources. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 107, n. 4, p.1570-1575, abr. 2008. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.09.075. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0308814607009934?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

VALENTE, Antonio Luiz Pires; AUGUSTO, Fabio. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, São Paulo, v. 4, n. 23, p.523-530, abr. 2000. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol23No4_523_v23_n4_\(15\).pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol23No4_523_v23_n4_(15).pdf)>. Acesso em: 14 set. 2015.

VAN BOEKEL, M.a.j.s.. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnology Advances*, [s.l.], v. 24, n. 2, p.230-233, mar. 2006. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2005.11.004. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S073497500500145X?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 03 nov. 2015.

VAN OPSTAELE, Filip et al. Characterization of Novel Varietal Floral Hop Aromas by Headspace Solid Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry/Olfactometry. **J. Agric. Food Chem.**, [s.l.], v. 60, n. 50, p.12270-12281, 19 dez. 2012. American Chemical Society (ACS). DOI: 10.1021/jf304421d.

VARNAM, Alan H.; SUTHERLAND, Jane P.. **Bebidas - Tecnologia Química Y Microbiología**: Alimentos básicos serie 2. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., 1994. 487 p.

VAS, György; VÉKEY, Károly. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal Of Mass Spectrometry*, [s.l.], v. 39, n. 3, p.233-254, mar. 2004. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/jms.606.

VÁZQUEZ-ARAÚJO, Laura et al. Use of hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction to characterize the volatile composition of different hop cultivars. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [s.l.], v. 93, n. 10, p.2568-2574, 8 mar. 2013. Wiley-Blackwell. DOI: 10.1002/jsfa.6078.

VERSTREPEN, Kevin J. et al. Flavor Active- Sters: Adding Fruitiness to Beer. **Journal Of Bioscience And Ingennering**, [S.l.], v. 96, n. 2, p.110-118, dez. 2003. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1389172303901125/1-s2.0-S1389172303901125-main.pdf?_tid=f8cdd010-802d-11e5-b9100000aabb0f02&acdnat=1446337244_ef7fd036b022a7f4062a22729ce4c9b3>. Acesso em: 31 out. 2015.

WANG, Yuxia et al. Different influences of β -glucosidases on volatile compounds and anthocyanins of Cabernet Gernischt and possible reason. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 140, n. 1-2, p.245-254, set. 2013. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.044. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0308814613002033?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 01 nov. 2015.

WELKE, Juliane E. et al. Volatile Characterization by Multivariate Optimization of Headspace-Solid Phase Microextraction and Sensorial Evaluation of Chardonnay Base Wines. **J. Braz. Chem. Soc.**, S.l., v. 23, n. 5, p.678-687, abr. 2012.

YAHYA, Hafiza; LINFORTH, Robert S.t.; COOK, David J.. Flavour generation during commercial barley and malt roasting operations: A time course study. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 145, p.378-387, fev. 2014. Elsevier BV. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.08.046. Disponível em: <<http://api.elsevier.com/content/article/PII:S0308814613011187?httpAccept=text/xml>>. Acesso em: 03 nov. 2015

ZALUSKI, Franciele. **Imobilização de β -glicosidase em quitosana e aplicação visando a melhora do perfil aromático de vinhos**. 2015. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

ZAMBON, E.R.C.S. et al. Study of the Chemical Composition of Essential Oils by Gas Chromatography. *Gas Chromatography in Plant Science, Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*. Dr. BekirSalih (Ed.), (2012). ISBN: 978-953- 51-0127-7, InTech, Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/gas-chromatography-in-plant-sciencewine-technology-toxicology-and-some-specific-applications/study-of-the-chemical-composition-of-essentialoils>. Acesso em 04 nov. 2015