

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

KARINE PEIXOTO DE AQUINO

**DESTINO DA AFLATOXINA B₁ DURANTE A PRODUÇÃO DE CERVEJA
ARTESANAL A PARTIR DE MALTE DE TRIGO CONTAMINADO**

JOÃO PESSOA

2022

KARINE PEIXOTO DE AQUINO

**DESTINO DA AFLATOXINA B₁ DURANTE A PRODUÇÃO DE CERVEJA
ARTESANAL A PARTIR DE MALTE DE TRIGO CONTAMINADO**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento a parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

Orientadora: Prof^a Dra Marciane Magnani

JOÃO PESSOA

2022

A657d Aquino, Karine Peixoto de.

Destino da aflatoxina B1 o durante a produção de
cerveja artesanal a partir de malte de trigo
contaminado / Karine Peixoto de Aquino. - João Pessoa,
2022.

98 f. : il.

Orientação: Marciane Magnani.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Micotoxinas - Aflatoxina B1. 2. Cerveja artesanal
- Trigo. 3. Cerveja artesanal - Parâmetros de
qualidade. 4. Compostos orgânicos. I. Magnani,
Marciane. II. Título.

UFPB/BC

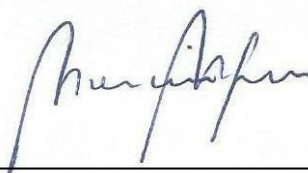
CDU 582.288(043)

KARINE PEIXOTO DE AQUINO

**DESTINO DA AFLATOXINA B₁ DURANTE A PRODUÇÃO DE CERVEJA
ARTESANAL A PARTIR DE MALTE DE TRIGO CONTAMINADO**

Dissertação aprovada em 28/09/2022

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Marciane Magnani

DEA/CT/UFPB

Presidente da Banca examinadora



Profª Jailane de Souza Aquino

DN/CCS/UFPB

Examinadora Interna



Profª Eliana Badiale Furlong

DQM/EQA/FURG

Externa à instituição

Kataryne Árabe Rimá de Oliveira
DN/CCS/UFPB
Examinadora suplente interna

Verônica Ortiz Alvarenga
DEA /UFMG
Examinadora suplente externa

*“O horror visível tem menos poder sobre a
alma do que o horror imaginado”*

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

A caminhada foi mais longa do que imaginei, o fardo se tornou mais pesado do que um dia imaginei. Apesar de todo o medo e angústias, estou chegando ao fim dessa caminhada.

Agradeço à Deus por nunca me deixar duvidar de seu amor por mim, por me mostrar que sempre estive ao meu lado mesmo quando achei que estava sozinha, por não me deixar desistir.

Tenho profunda gratidão a meus pais João Almir e Selma Lopes, que sempre me incentivaram, sempre estiveram disponíveis para me ajudar, e por sempre me darem forças todas as vezes que liguei chorando e com medo de não ser capaz. Meus irmãos Elisiário Neto e Kaylla Aquino por serem base, por serem apoio mesmo distantes, eu amo muito vocês.

Agradeço a minha orientadora, Marciane Magnani, que em nenhum momento desistiu de mim, mesmo quando o pôde fazer, por me ajudar e sempre me dizer que o medo maior estava na mente, mas que eu era capaz de conseguir concluir.

Na caminhada tive muitos anjos comigo, me ajudando, me ouvindo, Danieli Schabo que está desde o começo ao meu lado, me deu muitas dicas, me ajudou em tudo e sempre estive disponível. Fabrícia França chegou já no final, mas nem por isso foi menos importante, agradeço toda a paciência no processo. Whyara Almeida, obrigada por ter me ouvido tantas vezes, obrigada por tantas palavras de apoio, seu Gilvandro que tanto me ajudou com algumas análises.

As meninas do laboratório, por todo o tempo que fizemos os experimentos, Mayara Grilo, Louise Iara, Jade Moraes, Isis Meireles, meninas, vocês foram primordiais em toda essa caminhada.

Naís Lira, Larissa Ramalho, o mestrado me trouxe vocês, encontrei nessa amizade a força que eu precisava para continuar, o apoio e as palavras que me mostraram que eu era mais forte do que imaginava.

Ingrid Nicácio, Isabela Lira, Thiago Menezes, Ysa Argolo, amo muito vocês e sou grata pelo apoio que tive nesse processo.

Agradeço também as instituições que me ajudaram com algumas análises, agradeço a professora Eliana Badiale Furlong e professor Marcos dos Santos Lima pela disponibilidade em auxiliar no processo.

A todos que mesmo que não tenham sido citados, me acolheram e ajudaram, minha eterna gratidão.

RESUMO

Grãos de trigo podem ser contaminados por fungos toxigenicos, que em condições favoráveis produzem micotoxinas. Dentre as micotoxinas, a aflatoxina B1 (AFB₁) se destaca devido aos efeitos carcinogênicos ao homem e aos animais. Embora grãos de trigo sejam maltados para utilização na produção de cerveja artesanal em condições que favorecem a produção de AFB₁, pouco é sabido sobre o destino desta micotoxina durante a produção da cerveja. Esta pesquisa aborda a quantificação dos teores de AFB₁ nas diferentes etapas da produção da cerveja artesanal de trigo, bem como no produto final elaborado com malte de trigo contaminado. Ainda, foi realizada a contagem de células de levedura durante a fermentação, e a quantificação de açúcares, ácidos orgânicos, álcoois e compostos fenólicos durante as etapas da produção. Por fim, foram verificados os parâmetros de qualidade do produto final, incluindo pH, densidade, cor, extrato seco e acidez. Os açúcares identificados em maior quantidade nas amostras analisadas durante a produção da cerveja foram maltose (57.95 ± 1.00 mg/L), no mosto doce, e glicose (14.76 ± 0.02 mg/L) no mosto (M), respectivamente. Os principais compostos fenólicos identificados no mosto o principal fenólico foi o ácido clorogênico (0.88 ± 0.02 mg/L) e no mosto doce o ácido sirínico (SW = 4.06 ± 0.03 mg/L). Na cerveja (produto final) os fenólicos majoritários foram a procianidina A2 (56.05 ± 0.03 mg/L), seguido por catequina (15.04 ± 0.02 mg/L), ácido caftárico (1.88 ± 0.02 mg/L). Os álcoois presentes nas amostras finais (mosto doce e cerveja) foram etanol e glicerol, sendo que o etanol foi detectado em quantidades adequadas (42.51 ± 0.02 mg/L) para uma cerveja artesanal, de acordo com dados da literatura para esse tipo de cerveja. Os valores de pH nas amostras contaminadas foram os mesmos das amostras não contaminadas, variando apenas na faixa de 0,03 - 0,20. A acidez teve um decréscimo de 0,16 ao comparar as amostras M e B. A cor L* variou de 4,8 nas amostras M e B assim como a* e b* variaram de 0,3 e 0,19 entre as mesmas amostras citadas. O TDE variou consideravelmente entre as amostras M e B, com um decréscimo de 10,97. O número total de células estava na faixa de 10^8 células/ml para cada lote de fermentação. A viabilidade das leveduras foi variável de acordo com a presença do contaminante na amostra selecionada. Em relação a determinação de AFB₁, de acordo com os resultados, a AFB₁ foi detectada em todas as amostras coletadas durante a fabricação de cerveja artesanal de trigo feita com malte de trigo contaminado. As concentrações variam de 1,23–0,71µg/kg para amostras sólidas e 0,34–0,11µg/L para amostras líquidas. A produção de AFB₁ no malte de trigo (WM) e grão de malte (MG) foi de 1,23 µg/kg e 1,01 µg/kg, respectivamente. Estes resultados alertam

para a necessidade do monitoramento e determinação de limites para (AFB₁) em cerveja artesanal de trigo.

Palavras-chave: micotoxinas; cerveja artesanal de trigo; parâmetros de qualidade; compostos orgânicos.

ABSTRACT

Wheat grains can be contaminated by oxygen fungi, which under conditions can tolerate mycotoxins. Among the mycotoxins, aflatoxin B1 (AFB1) stands out due to its carcinogenic effects on humans and animals. Although wheat grains are malted for use in artisanal production under conditions that favor the production of AFB1, little is known about the fate of this mycotoxin during beer production. This research addresses the quantification of the different theories of AFB1 in the stages of production of wheat craft beer, as well as in the final product made with contaminated wheat malt. Furthermore, it was a count of fermentation cells during fermentation, and a quantification of sugars, organics, alcohols and phenolic compounds during the stages of organic production. Finally, the quality parameters of the final product were selected, including pH, density, dry density and description. Those identified during the highest amount in their maltose beers (5700 mg/L), in the wort ± 1 mg/L, in the sweet wort. The main phenolic compounds did not identify the wort, the main phenolic was chlorogenic acid (0.88 ± 0.02 mg/L) and not the sweet wort, the syringic acid (SW = 4.06 ± 0.03 mg/L). In beer (final product) the major phenolics were procyanidin A2 (56.05 ± 0.03 mg/L), followed by catechin (15.04 ± 0.02 mg/L), caftaric acid (1.88 ± 0.02 mg/L). The craft beer alcohols accords to a craft beer to that of ethanol with data. The pH values in the contaminated samples were the same as in the uncontaminated samples, ranging from 0.03 - 0.20. A had a decrease of 0.16 when comparing samples M and B. The color L* varied from 4.8 in samples M and B as well as a* and b* varied from 0.3 and 0.19 between the same samples. cited. The TDE varied considerably between samples M and B, with a decrease of 10.97. The total number of cells in the range of 108 cells/ml for each fermentation batch. The possibility of yeasts was variable according to the presence of the selected contaminant. In wheat AFB1 determination was made, according to the results, AFB1 was elaborated in all samples collected during the brewing of beer with contaminated wheat malt. As $- / 0.23$ g follow-up $1.23.7 \mu\text{g/kg}$ for continuous sequences⁴ and $0.3 \mu\text{L} \cdot 1 \mu\text{L}$ for liquid samples The production of AFB1 in wheat malt (WM) and malt grain (MG) was $1.23 \mu\text{g /kg}$ and $1.01 \mu\text{g/kg}$, respectively. These results alert to the need for monitoring and determination of limits for (AFB1) in wheat craft beer.

Keywords: mycotoxins; wheat craft beer; quality parameters; organic compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Crescimento do número de cervejarias por ano.....	18
Figura 2 – Ciclo de vida do <i>Aspergillus</i>	24
Figura 3 – Estrutura química das Aflatoxinas B ₁ , B ₂ , G ₁ e G ₂	25
Figura 4 – Diagrama das etapas experimentais do estudo.....	31
Figura 5 – Ácidos de lúpulo, estruturas e reação química.....	35
Quadro 1 – Elementos distintos que definem os diferentes tipos e estilos de cerveja	14
Quadro 2 – Estilos de cerveja de acordo com os critérios de classificação.....	166
Quadro 3– Descrição das etapas da produção da cerveja e código correspondente.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coleta de amostras para contagem de células de levedura durante a fermentação do mosto.	40
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	CERVEJA: HISTÓRICO E DEFINIÇÕES	13
2.2	CERVEJA ARTESANAL	17
2.3	PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL	19
2.3.1	Cerveja artesanal de trigo	22
2.4	QUALIDADE DA CERVEJA ARTESANAL.....	23
2.5	<i>Aspergillus flavus</i> E AFLATOXINAS	23
2.6	CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINAS EM CERVEJAS ARTESANAIS	26
2.6.1	Métodos de determinação e extração das aflatoxinas em cervejas	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	DESENHO DO ESTUDO	31
3.2	MATÉRIA-PRIMA	31
3.2.1	Malteação experimental dos grãos de trigo para produção de AFB₁.....	31
3.3	PRODUÇÃO DA CERVEJA ARTESANAL DE TRIGO EM ESCALA LABORATORIAL	33
3.3.1	Da moagem ao resfriamento.....	33
3.3.2	Fermentação e maturação	36
3.3.3	Quantificação de AFB₁ nas etapas de produção de cerveja.....	36
3.4	DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E ÁLCOOIS DURANTE A PRODUÇÃO DA CERVEJA ARTESANAL DE TRIGO	38
3.5	DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E FENÓLICOS DURANTE A PRODUÇÃO DA CERVEJA ARTESANAL DE TRIGO.....	38
3.6	DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DURANTE A FERMENTAÇÃO DO MOSTO.....	39
3.7	CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA DURANTE A FERMENTAÇÃO DO MOSTO	39
3.8	DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE NO PRODUTO FINAL.....	40
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	40
4	RESULTADOS	41
	REFERÊNCIAS	42
	APÊNDICE A – ARTIGO:	52

1 INTRODUÇÃO

O setor de bebidas alcoólicas é um dos segmentos da indústria que mais cresce no mundo, e um dos fatores que tem contribuído para esse crescimento nos últimos anos é a popularização da cerveja artesanal (EINFALT, 2021). Os consumidores são, cada vez mais, atraídos por tipos e sabores de cerveja frescos e criativos oferecidos por cervejarias artesanais e microcervejarias (ERHARDT *et al.*, 2022). O Brasil se encontra em terceiro lugar no ranking dos maiores produtores de cerveja, ficando atrás apenas da China e dos Estados Unidos, sendo responsável pela movimentação de 160 bilhões por ano, correspondendo a 1,7% do PIB nacional (CERVBRASIL, 2022).

Há uma expectativa sobre a qualidade e as características da cerveja artesanal, que tem direcionado modificações nos processos e na matéria-prima utilizada para a produção deste tipo de cerveja (SALANȚĂ *et al.*, 2020). Para obtenção e diversidade de perfis sensoriais na cerveja artesanal, são utilizados diferentes adjuvantes como sorgo (EINFALT, 2021), trigo maltado (BYEON *et al.*, 2021), variedades de lúpulo (DE SIMONE *et al.* 2021; HOPFER *et al.*, 2021) e diferentes cepas de leveduras na fermentação (EINFALT, 2021; MATRAXIA *et al.*, 2021). Na produção da cerveja artesanal, de modo geral, o principal componente da cerveja tradicional é o malte de cevada, que pode representar mais de 90% do peso seco do mosto. A cerveja artesanal de trigo, por outro lado, é composta por uma proporção de 50% de trigo cru, maltado ou não maltado, para malte de cevada (FLAVIIS *et al.*, 2022).

Além disso, comparado às cervejas industriais, o processo de produção da cerveja artesanal não inclui a pasteurização e filtração, o que leva a uma suscetibilidade maior de deterioração microbiana (VASAS; TANG; HATZAKIS, 2021), contaminações que podem alterar os caminhos metabólicos durante o malteamento e da própria levedura, durante a atividade fermentativa (KŁOSOWSKI *et al.*, 2010) e na composição do produto final, especialmente no que se refere aos açúcares redutores e compostos fenólicos (NATHANAIL *et al.*, 2016; MASTANJEVIĆ *et al.*, 2018). A cerveja se destaca como um alimento rico em polifenóis, recomendado para evitar doenças causadas pelo estresse oxidativo (OSORIO-PAZ, BRUNAUER, ALAVEZ, 2019). No entanto, a presença de alguns contaminantes e, até mesmo do álcool, afetam esse perfil fenólico e a presença de outros compostos com alto valor nutricional (SILVA *et al.*, 2021).

Mastanjević *et al.* (2018) investigaram a influência da contaminação por micotoxinas, como o deoxinivalenol (DON), nos parâmetros de fermentação em cerveja de trigo e, de acordo com os resultados encontrados, os níveis de micotoxinas no mosto modificaram as

concentrações dos produtos finais (etanol e glicerol) sutilmente. Além disso, apresentaram influência maior na dinâmica da fermentação alcoólica, em que a fermentação primária durou um pouco mais onde foi utilizado malte contaminado com *F. culmorum*. Kłosowski *et al.* (2010) investigaram como as micotoxinas nas matérias-primas afetaram o estado fisiológico e a atividade dos microrganismos utilizados nas operações de fermentação. A atividade da álcool desidrogenase é inibida por AFB₁ e tricotecnos, o que diminui a atividade de fermentação e a liberação de CO₂.

Estas evidências de contaminação vêm motivando um controle mais rigoroso durante a produção da cerveja artesanal, pois podem ocorrer contaminações advindas da matéria-prima e do processo de produção, que podem representar riscos à saúde dos consumidores (SCHABO *et al.*, 2021). Os grãos utilizados como matéria-prima para obtenção do malte, ou mesmo como adjuvantes na cerveja podem ser contaminados com micotoxinas como as fumonisinas B₁ (FB₁) e B₂ (FB₂), aflatoxinas B₁ (AFB₁) e B₂ (AFB₂) e ocratoxina A (OTA), que são produzidas por fungos filamentosos, como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (KLIMCZAK; CIOCH-SKONECZNY, 2020), antes da colheita ou durante o armazenamento (PHAN *et al.*, 2021). A micotoxina mais conhecida é a aflatoxina B₁ (AFB₁), que é mais comumente associada ao milho e ao amendoim. Sua presença no trigo se deve, geralmente, ao armazenamento (ZAHRA, 2019), podendo também ocorrer no campo de acordo com as condições climáticas (JOUBRANE *et al.*, 2020).

Estudos realizados por Schabo *et al.* (2020a; 2020b) relataram que as aflatoxinas (AFs) podem ser transferidas de grãos contaminados de trigo para a cerveja, podendo causar diversos problemas à saúde devido a exposição crônica. Alguns destes problemas incluem, carcinomas hepáticos (MARCHESE *et al.*, 2018), necrose hepática aguda (JANIK *et al.*, 2020), cirrose e outras complicações (ADEYEYE, 2022). A contaminação de grãos de trigo vem sendo registrada e, considerando as diferentes aplicações deste grão, é uma toxina muito estudada em cereais e derivados. No entanto, poucos estudos têm explorado a contaminação de cervejas fabricadas com este grão (AGRIOPOULOU; STAMATELOPOULOU; VARKAZAS, 2020), mesmo sendo largamente utilizado no processo de produção da cerveja artesanal (VILLACRECES; BLANCO; CABALERO, 2022).

Mediante o exposto, o objetivo do presente trabalho foi quantificar os níveis de AFB₁ nas diferentes etapas da produção de cerveja artesanal de trigo, como também no produto final elaborado com malte de trigo contaminado. A densidade foi avaliada durante a fermentação do mosto e a contagem de leveduras. Açúcares, ácidos orgânicos, álcoois e compostos fenólicos,

também foram determinados durante a produção da cerveja, assim como a avaliação dos parâmetros de qualidade do produto final.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CERVEJA: HISTÓRICO E DEFINIÇÕES

Os primeiros indícios de produção de bebidas fermentadas vêm da China, em que eram utilizadas uvas silvestres, arroz e mel como base para a fermentação. Descobertas arqueológicas ainda indicam evidências de produção de bebidas fermentadas na Mesopotâmia, Egito, Grécia antiga, sendo que a cerveja ficou mais popular entre as populações germânicas e celtas, uma vez que houve uma difusão do vinho pelos países da Europa em 650 a.C. (JÍLEK *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2019).

O Egito se destaca como uma das civilizações importantes para o processo de produção de cerveja (BREWER; TEETER, 2007). Em 5.000 a.C., as atividades comerciais eram estabelecidas pela panificação e produção de cerveja, em que os grãos de cevada e trigo serviam como pagamento de salário e eram utilizados como ingredientes base desses dois principais alimentos da dieta (BAUMGARTHUBER, 2021; HARDWICK, 1994; PAULETTE, 2021).

Alguns pesquisadores trazem as definições de cerveja que destacam os ingredientes principais e as variações mais comuns. Hardwick (1994) define a cerveja como uma “bebida obtida a partir da fermentação alcoólica de um extrato aquoso de grão de cereal maltado”, em que este pode ser substituído por outros materiais contendo amido ou açúcares fermentáveis e a adição de outros materiais fornecem diferentes características ao produto final. Para Keukeleire (2000) a cerveja é uma bebida alcoólica fermentada que tem como ingredientes essenciais: o malte de cevada, a água o lúpulo e o fermento. A complexidade do seu processo de produção permite a existência de diferentes variedades (MELLOR; HANNA-KHALIL; CARSON, 2020), que podem ser oriundas do tipo de malte utilizado, da utilização de outros adjuntos cervejeiros, do tipo de lúpulo (KUMAR 2020), do processo de produção, dentre outros aspectos (DE SIMONE, 2021; MAICAS, 2020).

Os avanços tecnológicos modificaram os procedimentos realizados para a fabricação da cerveja, que possui inúmeras variedades de aroma, sabor e amargor, sendo produzida de diferentes formas para alcançar diferentes resultados (BAMFORTH, 2017; VILLACRECES; BLANCO; CABALLERO, 2021). Dentre as definições dessa bebida, a fermentação alcoólica do extrato de cereais maltados representava bem a que era produzida pelos povos mais antigos (STEWART; RUSSEL; ANSTRUTHER, 2017). Atualmente, uma das principais modificações no processo de produção é a adição do lúpulo durante o processo de produção para fornecer

aromas (ARRUDA *et al.*, 2021), que podem ser mais suaves ou mais intensos (KORPELAINEN, PIETILÄINEN, 2021).

Na definição oficial pelo decreto nº 6.871, de 2009 a cerveja é uma bebida alcoólica resultante da fermentação do mosto de cevada maltada ou de extrato de malte, sendo adicionado ao mosto, em um processo de cocção, lúpulo ou extrato de lúpulo. Conforme o decreto, a cevada maltada ou o extrato de malte podem ser substituídos por adjuntos cervejeiros (milho, trigo, arroz), desde que seja uma substituição parcial (BRASIL, 2009).

Além disso, o decreto traz os artigos que definem alguns conceitos importantes sobre a cerveja, como o conceito de malte e a classificação da cerveja de acordo com alguns aspectos:

I – quanto ao extrato primitivo, em: Cerveja leve; Cerveja ou cerveja comum; Cerveja extra; Cerveja forte; II – quanto a cor em: Cerveja clara; Cerveja escura; Cerveja colorida. III – quanto ao teor alcoólico, em: Cerveja sem álcool; Cerveja com álcool. IV – quanto à proporção de malte de cevada, em: Cerveja puro malte; Cerveja; “Cerveja de...” (seguido do nome do vegetal utilizado); V – quanto a fermentação, em: de baixa fermentação; de alta fermentação (BRASIL, 2009, p. 17-18).

Esses aspectos influenciam nas mudanças que podem ocorrer quando se define a cerveja. De modo geral, alguns aspectos são essenciais, mas suas combinações podem alterar o produto final. Outros elementos envolvem os diferentes tipos e estilos de cerveja, como a combinação da cultura, embalagem, marketing (PAPAZIAN *et al.*, 2018)

De acordo com Papazian *et al.* (2018), pode-se destacar alguns pontos essenciais para cada um desses elementos. O quadro 1 foi construído a partir dos detalhes propostos pelo autor sobre como os diferentes estilos de cerveja são criados a partir de dois elementos principais: ingredientes e processo.

Quadro 1 – Elementos distintos que definem os diferentes tipos e estilos de cerveja.

Elementos	Variações	Pontos importantes
Ingredientes	Água	O balanço dos minerais presentes na água pode influenciar o aroma e a percepção do malte, lúpulo e dos produtos da fermentação.
	Carboidratos fermentáveis	Existe uma variedade de grãos fermentáveis que pode ser utilizado pela indústria da cerveja. O malte influencia na cor, sabor, aroma, teor alcoólico. A combinação de diferentes tipos de malte pode criar extraordinárias variedades de características na cerveja
	Lúpulo	Os tipos de lúpulo, o tempo da adição, a quantidade, as combinações e outras circunstâncias criam uma variedade de características na cerveja, principalmente, em aroma e sabor.
	Fermento	Existem basicamente dois tipos de fermento: “Lager” (<i>Saccharomyces pastorianus</i>) e “Ale” (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>). Os diferentes tipos de cepa produzem características específicas,

Continua

Elementos	Variações	Pontos importantes
		como tipos de álcool e compostos fenólicos que conferem sabor e aroma diferentes.
Processo	Configuração e design do equipamento	Pode influenciar na cor (grau de caramelização), estabilidade do produto (claridade e oxidação), utilização do lúpulo (amargor, sabor e aroma).
	Moagem dos grãos	Tipo e extensão da moagem podem afetar o caráter da cerveja.
	Esmagamento	A maceração (infusão) pode variar aspectos como nível de álcool, aroma de malte, caráter do sabor do malte, estabilidade da espuma e retenção de espuma, sensação na boca e equilíbrio do sabor.
	Separação do mosto e grãos	Pode influenciar na característica frutada (éster) e o uso de filtro de <i>Mash</i> no lugar de um tanque pode variar a composição do mosto e desempenho da levedura
	Ebulição	Tempo de ebulição influencia, principalmente, no amargor do lúpulo, aroma e sabor. Além disso, o vigor da ebulição afeta a estabilidade e a espuma no final do processo.
	Temperatura de fermentação	Afeta o comportamento do fermento e, no fim, sabor e aroma e supressão de vários compostos que conferem características importantes para a cerveja.
	Tempo de maturação	Influenciam na qualidade e balanço da cerveja.
	Filtração	Utilizado para clarificação, pode influenciar na estabilidade microbiológica de alguns tipos de cerveja. E também pode retirar alguns compostos importantes para a qualidade.

Fonte: Adaptado de Papazian *et al.* (2018, p. 37-41)

A combinação de apenas dois dos elementos considerados importantes altera a composição final de diversas maneiras, demonstrando a versatilidade e a capacidade de ter variadas definições e características importantes (CALLEJO *et al.*, 2019; PAPAIZIAN *et al.*, 2018). Apesar disso, os ingredientes, sua qualidade, pureza, origem, tipo, atuação, desempenham um papel essencial na produção da cerveja (CALLEJO *et al.*, 2019).

A Associação de cervejeiros dos EUA (BREWERS ASSOCIATION, 2022) possui alguns critérios de classificação em estilos e traz mais de 103 estilos que variam entre híbridos ou mistos, Lager e Ale, além de uma subcategoria por origens, como é mostrado no Quadro 2:

Quadro 2 – Estilos de cerveja de acordo com os critérios de classificação

Estilo de cerveja híbrida ou mista	Estilo de cerveja Lager	Estilo de cerveja Ale
1. Cerveja de trigo americana 2. Cerveja frutada 3. Cerveja de trigo frutada 4. Cerveja do campo 5. Cerveja de abóbora 6. Cerveja de pimenta 7. Cerveja com ervas e especiarias 8. Cerveja de chocolate 9. Cerveja de café 10. Café Stout ou Porter 11. Cerveja especial 12. Cerveja de centeio 13. Cerveja de mel 14. Cerveja sem álcool 15. Cerveja <i>session</i> (baixo teor alcoólico) 16. Cerveja Session India Pale Ale 17. Outra cerveja forte 18. Cerveja experimental 19. Cerveja experimental India Pale Ale 20. Cerveja Experimental com Envelhecimento de Madeira 21. Cerveja histórica 22. Cerveja sem gluten 23. Ale estilo belga americano 24. Sour Ale Estilo Americano 25. Sour Ale Frutada Estilo Americano 26. Cerveja Brett 27. Cerveja Brett de cultura mista 28. Cerveja envelhecida em madeira e barril 29. Cerveja forte envelhecida em madeira e barril 30. Stout forte envelhecido em madeira e barril 31. Cerveja ácida envelhecida em madeira e barril 32. Cerveja ácida envelhecida em madeira e barris de frutas 33. Kellerbier ou Zwickelbier 34. Cerveja Fumada (<i>Smoke beer</i>)	35. Lager leve internacional 36. Pilsener internacional ou Lager internacional 37. Lager hoppy 38. Lager escura International 39. Pilsener de estilo alemão 40. Pilsener de estilo boêmio 41. Luz estilo Munique 42. Dortmunder / Export ou Oktoberfest de estilo alemão 43. Lager de Estilo Viena 44. Maerzen de estilo alemão ou Rotbier de estilo da Francônia 45. Lager escura europeia 46. Schwarzbier de estilo alemão 47. Bock ou Maibock de estilo alemão 48. Doppelbock ou Eisbock de estilo alemão 49. Lager Estilo Americano 50. Lager contemporânea de estilo americano 51. American-Style Pilsener 52. Cream Ale estilo americano 53. American-Style Amber Lager	54. Pale Ale estilo australiano 55. Pale Ale internacional 56. Amargo Extra Especial 57. International India Pale Ale 58. Cerveja Cevada Estilo Vinho 59. Koelsch de estilo alemão 60. Sour Ale de Estilo Alemão 61. Weisse de estilo berlinense especializado 62. Gose Contemporânea 63. Hefeweizen de estilo alemão do Sul 64. Ale de Trigo Estilo Alemão 65. Altbier de estilo alemão 66. Table Beer Belga ou Sessão Ale Estilo Belga 67. Ale de Estilo Belga ou Ale de Estilo Francês 68. <i>Witbier</i> de estilo belga 69. Temporada Clássica 70. Temporada especial 71. Sour Ale estilo belga 72. Abbey Ale estilo belga 73. Tripel estilo belga 74. Cerveja de especialidade forte de estilo belga 75. Cerveja de frutas belga 76. Inglesa leve ou amarga 77. Ale Inglesa 78. Brown Ale estilo inglesa 79. <i>Brown Porter</i> 80. <i>Robust Porter</i> 81. <i>Sweet Stout</i> ou <i>Cream Stout</i> 82. Stout de aveia 83. Imperial Stout de Estilo Britânico 84. Old Ale ou Strong Ale 85. Red Ale irlandês 86. Stout de estilo irlandês clássico 87. <i>Export Stout</i> 88. Cerveja estilo escocês 89. Scotch Ale 90. Golden ou Blonde Ale 91. Pale Ale estilo americano 92. Suculenta ou Hazy Pale Ale 93. Strong Pale Ale estilo americano 94. Juicy ou Hazy Strong Pale Ale 95. Imperial India Pale Ale 96. Juicy or Hazy Imperial India Pale Ale 97. Amber / Red Ale estilo americano 98. Strong Red Ale 99. Brown Ale estilo americano 100. American-Style Black Ale ou American-Style Stout 101. Imperial Stout Estilo Americano

Continua

Estilo de cerveja híbrida ou mista	Estilo de cerveja Lager	Estilo de cerveja Ale
		102. India Pale Ale estilo americano 103. Juicy ou Hazy India Pale Ale

Fonte: BREWERS ASSOCIATION (2022)

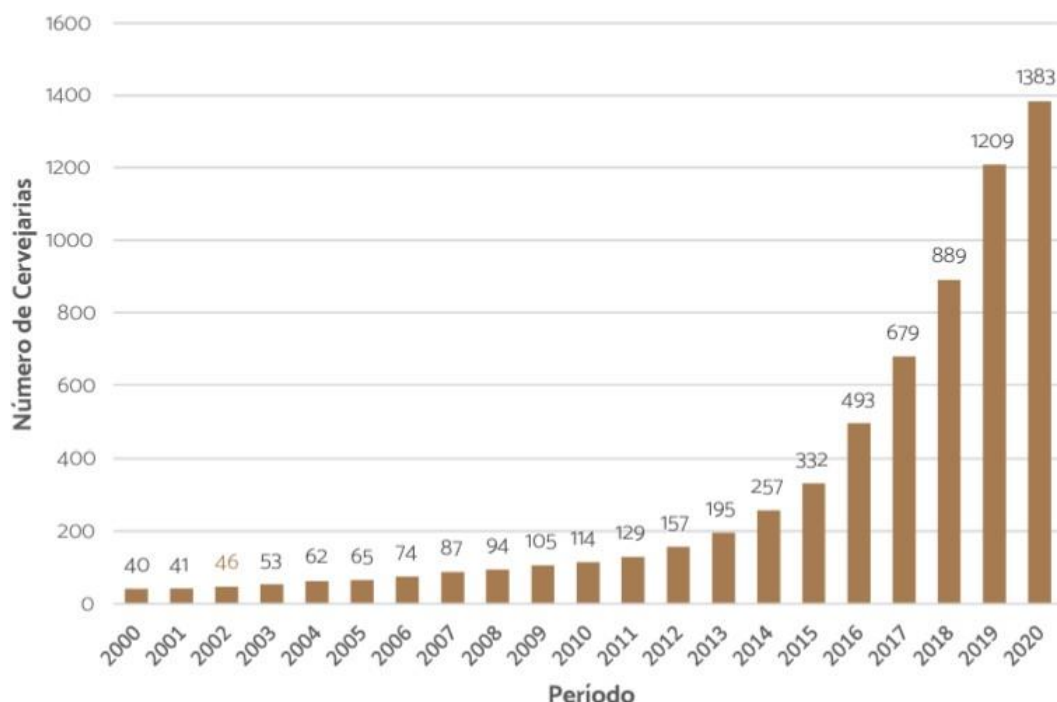
2.2 CERVEJA ARTESANAL

Segundo a Associação dos Cervejeiros Artesanais do Brasil (2021), cervejarias artesanais vêm ganhando espaço no setor cervejeiro brasileiro. Os adeptos desse estilo buscam a volta da história, da cultura e da qualidade da bebida, visto como uma grande oportunidade de negócios e atraído interessados em investir na produção (RIVAROLI; CALVO-PORRAL; SPADONIA, 2022).

No início do século XX o número de produtores de cerveja artesanal teve uma queda, pois as indústrias passaram a comprar e produzir um único estilo de cerveja, reduzindo o valor e aumentando a concorrência com os pequenos produtores, o que levou essas microcervejarias à falência (JANTYIK; BALOGH; TÖRÖK, 2021). Porém, a produção em larga escala não oferece uma variedade de sabores e estilos, o que tem contribuído para uma demanda crescente por cerveja artesanal nos últimos anos (CABRAS, 2021). Além disso, houve a possibilidade de desenvolvimento de cervejarias independentes pela criação de legislações e financiamentos que permitem a aquisição de equipamentos, principalmente em países como os EUA, em que a cada oito cervejas comercializadas, uma é artesanal (BREWER ASSOCIATION, 2022).

No Brasil, houve um crescimento considerável no número de cervejarias independentes nos últimos anos, alcançando mais de 30% de aumento desde 2018, chegando a atingir uma marca de mais de 1.300 cervejarias (Figura 1), de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2021).

Figura 1 - Crescimento do número de cervejarias por ano



Fonte: MAPA (2021)

Em relação as pesquisas e publicações relacionadas a cervejas artesanais, a busca pelo termo “*craft beer*”, no título do artigo, fornece 295 resultados, em que 258 são dos últimos 5 anos (2017 a 2022), demonstrando o aumento do interesse em pesquisas científicas pela cerveja artesanal nos últimos anos. Quando a pesquisa é realizada com o termo “*artisanal beer*” o resultado são nove artigos, dentre os quais sete desses foram publicados nos últimos 5 anos (SCOPUS, 2022).

De acordo com a *Brewer Association* (2022) a cerveja artesanal é definida como aquela produzida em uma cervejaria pequena e independente, que utiliza ingredientes tradicionais como o malte de cevada, assim como outros não tradicionais, empregados para promover mudanças de sabor e aroma. O desenvolvimento de cervejas artesanais utilizando diferentes ingredientes como frutas, mel, ervas ou especiarias permite a geração de produtos com características únicas de aroma, sabor e cor, os quais não podem ser obtidos a partir dos ingredientes básicos da formulação (CARVALHO *et al.*, 2018; FANARI *et al.*, 2020) e os diferentes perfis sensoriais podem ser alcançados por mudanças nos insumos e no processo de produção utilizados (MATRAXIA *et al.*, 2021).

A cerveja artesanal se diferencia da cerveja comercial por características químicas e sensoriais, em que se encontram valores de cor, amargor e atividade antioxidante superiores

(com nível de significância estatística), além de níveis sensoriais visuais, olfativos e gustativos superiores, de acordo com estudos relacionados (ROSALES *et al.*, 2021).

No processo de produção da cerveja artesanal, apesar do lúpulo ser um ingrediente menor em termos de quantidade, ele é responsável por alterações no sabor (amargo), aroma, estabilidade e aparência (VILLACRECES *et al.*, 2022). Seu impacto é fundamental na qualidade da cerveja, sendo o emprego do lúpulo a seco (*dry hopping*) uma técnica utilizada para aumentar o aroma e o sabor intensos do lúpulo na cerveja artesanal, principalmente no último século (LAFONTAINE; SHELLHAMMER, 2018). Os pesquisadores destacam que foram obtidos melhores resultados com a utilização de uma taxa de *dry hopping* de 400–800 g/hL e que grande parte dos compostos presentes nesse procedimento são responsáveis pelo amargor da cerveja. Dentre os compostos de importância para as propriedades sensoriais especiais das cervejas artesanais também se destacam os ácidos orgânicos, açúcares, ésteres, terpenóides, polifenóis e compostos carbonílicos, que são influenciados pelo processo de fermentação (HUMIA *et al.*, 2019).

A forma como o lúpulo é utilizado na cerveja foi modificado a partir do mercado de cervejas artesanais, tornando-se um ingrediente chave no sucesso da cerveja artesanal, devido à demanda e produção de diferentes estilos de cervejas, como a Índia Pale Ale, Imperial IPA ou New England IPA entre outros estilos lupulados (VILLACRECES *et al.*, 2022). A *Brewers Association* (2022) tem um sistema de classificação das cervejas em estilos mistos, lager e ale e por origem (alemão, belga, francesa, americana, britânica, irlandesa ou outras origens), com 103 estilos diferentes, sendo 34 estilos mistos, 19 do estilo Lager e 50 do estilo Ale, dentre as quais estão a Cerveja de trigo americana, cervejas frutadas, cervejas de café, Pilsen de estilo alemão, dentre outras.

2.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL

A produção da cerveja artesanal envolve duas etapas principais: mosturação ou brasagem e a fermentação. O grão maltado, que pode ser cevada ou uma mistura com adjuvantes cervejeiros, é moído e suspenso em água para que os carboidratos complexos como o amido sejam degradados por meio de atividade enzimática em unidades mais simples (MOSHER; TRANTHAM, 2021). O líquido formado após esse procedimento é conhecido como mosto, rico em açúcar que, após a clarificação pela separação dos grãos gastos e do mosto, é submetido à atividade de leveduras de cerveja, gerando álcool e gás carbônico como produtos principais.

No caso da cerveja de trigo, o malte de trigo é misturado com o malte de cevada em uma proporção de 50-60% de malte de trigo (HU; JIN; DU, 2019).

Na moagem, o nível de quebra dos grãos é importante para garantir o máximo de integridade das cascas e a exposição do conteúdo interno para a atividade enzimática (EATON, 2017). Esse processo é importante para a etapa de clarificação, em que as cascas atuam como meio filtrante e elevam a eficiência do processo (HOLBROOK, 2020).

Na mosturação, a suspensão de maltes e água é submetida a uma rampa de temperatura que varia em tempo, para atingir as condições ótimas para a hidrólise enzimática (LEDLEY *et al.*, 2021). A temperatura inicial de 45 °C, sendo elevada após 20 minutos para uma temperatura de 55 °C que é importante para ativar a atividade da β -amilase. No período de 15-20 minutos, a temperatura é gradualmente aumentada até 65 °C, que é a temperatura de sacarificação e de atividade de α -amilase (faixa de temperatura de 55 e 65 °C e pH = 5,4 e 5,6) (MOSHER, TRANTHAM, 2021). Depois de aproximadamente 30 minutos a 65 °C, a temperatura é aumentada para 78 °C (*mashout*) com o objetivo de inativar a maioria das enzimas, diminuir a viscosidade do mosto doce e inativar micro-organismos contaminantes do malte (BAMFORTH; COOK, 2019).

A próxima etapa é a clarificação, em que o mosto doce é separado dos grãos em um filtro e fervido em uma caldeira, durante uma hora, para garantir a inativação total da atividade enzimática. Os grãos de malte gastos são lavados com água quente e filtrados para retirar a maior quantidade de açúcares possível e a água de lavagem é adicionada ao mosto doce (MOSHER, TRANTHAM, 2021). Procede-se à fervura, e o lúpulo é adicionado de uma vez no início, ou no final da fervura. O mosto doce é filtrado novamente para a retirada dos resíduos de lúpulo, sendo levada para o resfriamento em trocadores de calor, diminuindo a temperatura até 10 °C (OLAJIRE, 2020).

Na sequência, adiciona-se a levedura (específica do tipo de cerveja a ser produzida) ao mosto doce, com o objetivo de metabolizar constituintes do substrato para gerar etanol, dióxido de carbono e outros produtos de fermentação (CAPECE *et al.*, 2018). A utilização da levedura nesta etapa é responsável por afetar a complexidade sensorial do produto final, além de características como eficiência de fermentação ou capacidade de floculação (VILLACRECES *et al.*, 2022). As leveduras utilizadas irão depender do tipo de cerveja produzida, sendo classificadas como, cerveja de alta fermentação, utilizando-se a *Saccharomyces cerevisiae*, de baixa fermentação com a utilização da *Saccharomyces pastorianus*, de fermentação espontânea, realizada por leveduras e bactérias selvagens. Espécies híbridas também podem ser utilizadas,

como as leveduras tolerantes ao frio, a exemplo da *Saccharomyces bayanus* e *Saccharomyces uvarum* (IATTICI; CATALLO; SOLIERI, 2020).

Durante a fermentação do mosto com a levedura, existem três fases importantes, a de adaptação, crescimento logarítmico e a maturação. Na fase de adaptação é estabelecido um equilíbrio entre o metabolismo celular e a concentração de açúcares no mosto, em que a levedura faz uso do oxigênio dissolvido e lipídeos para produzir esteróis e ácidos graxos. Na etapa de crescimento logarítmico ocorre o consumo dos açúcares para formação do produto alcoólico. Nessa etapa também são formados gás carbônico e compostos fenólicos (SALANȚĂ *et al.*, 2020). Na etapa da maturação, a cerveja verde, que ainda possui uma suspensão de leveduras e uma parte de material fermentescível, passa por uma fermentação secundária, um repouso prolongado (0-3 °C durante 15 dias ou mais) que contribui para a clarificação da cerveja e melhoria do sabor (KUMAR, 2020; THESELING *et al.*, 2019).

A alta concentração de produtos químicos fenólicos é uma característica distintiva da cerveja, considerada um alimento rico em polifenóis e recomendada para prevenir doenças ligadas ao estresse oxidativo (OSORIO-PAZ, BRUNAUER, ALAVEZ, 2019). Alguns estudos examinaram a presença de compostos fenólicos na cerveja. O ácido ferúlico compõe mais da metade dos seis compostos que parecem ser responsáveis pela maior parte (55-88%) da capacidade antioxidante em cervejas comerciais (ZHAO *et al.*, 2010).

Os outros constituintes são ácido sirínico (ZHAO *et al.*, 2010), (+)-catequina, ácido cafeico, ácido protocatecuico (HEUBERGER *et al.*, 2016) e (-)-epicatequina (SHI *et al.*, 2017). Os compostos polifenólicos da cerveja, considerados uma das principais fontes de antioxidantes da bebida, são principalmente derivados do malte e do lúpulo. Cheiran *et al.* (2019) a pesquisa descobriu 57 compostos fenólicos usando medições HPLC-DAD-ESI-MS/MS, 12 dos quais nunca haviam sido descobertos em cerveja antes. Usando um método HPLC-MS/MS validado, Cortese *et al.* (2020) quantificaram com precisão 20 compostos fenólicos em seis tipos diferentes de cervejas artesanais.

Com isso, queremos ressaltar a importância do uso de ingredientes de origem natural na fabricação de cervejas artesanais, pois, como já foi indicado, isso pode melhorar significativamente a diversidade fenólica e a composição da bebida (HUMIA *et al.*, 2019). Além disso, as principais matérias-primas usadas para fazer cervejas artesanais são tipicamente cevada, lúpulo e, menos frequentemente, trigo, o que também pode contribuir para a abundância desses produtos químicos bioativos na bebida e abundância de compostos fenólicos (BETTENHAUSEN *et al.*, 2018).

2.3.1 Cerveja artesanal de trigo

A cevada (*Hordeum vulgare* L.) é considerada o principal grão de escolha para a produção do malte utilizado na cerveja (como um dos quatro ingredientes convencionais, junto com a água, o lúpulo e a levedura), devido as características do grão, como a alta quantidade de amido e baixa quantidade de proteína e firmeza da casca (BOUHLAL *et al.*, 2021).

Como a cerveja comum tem como ingrediente principal o malte de cevada, aquelas que utilizam o trigo são consideradas cervejas especiais. Com o crescimento das cervejarias artesanais, houve um resgate de alguns cereais além da cevada tradicional, como os grãos de trigo e trigo duro, ou pseudo-cereais, para compor novos sabores (ALBANESE *et al.*, 2018).

A cerveja de trigo foi bastante popular no início do século XVI, produzida com 50-60% de malte de trigo na região da Baviera (FALTERMAIER *et al.*, 2014). Atualmente, na Alemanha, as cervejas de trigo são amplamente comercializadas o que tem levado a um aumento na demanda de culturas agrícolas para esse grão (MASTANJEVIC *et al.*, 2018).

A popularidade da cerveja de trigo vem aumentando em todo o mundo (JIN *et al.*, 2018), sendo o cereal utilizado em alguns estilos de mistura, como na mistura de cevada maltada (60%), trigo comercial maltado (20%) e trigo típico não maltado (20%), que resulta em uma cerveja artesanal com maior teor de polifenóis e sabor mais equilibrado (MASCIA *et al.*, 2014).

O trigo (*Triticum aestivum* L.) e o trigo duro (*Triticum durum* Desf.) vêm sendo amplamente utilizado como matéria prima para a produção de cervejas e tem mostrado resultados promissores em relação a sabor e aroma (ALFEO *et al.*, 2019; BIANCO *et al.*, 2019).

A cerveja artesanal de trigo é tradicionalmente conhecida como *Weissbier* (do alemão *Weizen* - trigo) e difere da cerveja de malte de cevada pela turbidez, densidade da espuma, sabor frutado (cravo e banana) e baixo teor de lúpulo, que é utilizado apenas para balancear o dulçor dos maltes (trigo e cevada) (PAPAZIAN, 2017).

As cervejas artesanais de trigo possuem diferentes compostos aromáticos quando comparadas a outras cervejas, em que estes lhe conferem um sabor mais forte de malte, conferindo um sabor diferenciado para os diferentes tipos de cerveja de trigo (que podem ser produzidas com o trigo maltado ou não maltado).

Existem algumas variações de cerveja de trigo, como a *Dunkle Weissbier*, a *Weizenbock*, a *Leichtes Weisse*, que são variações da tradicional, podendo ser quentes ou mais amargas, mas que mantém o caráter sensorial da tradicional (PAPAZIAN, 2017).

2.4 QUALIDADE DA CERVEJA ARTESANAL

Durante a produção da cerveja artesanal alguns parâmetros são geralmente monitorados durante a fermentação como a temperatura, o pH, o teor de álcool, a análise de sólidos totais e a densidade, além de análises sensoriais como cor e amargor (ÍSILDAR; YILDIZ, 2020). As análises são realizadas utilizando métodos analíticos simples, porém validados que visam determinar esses parâmetros importantes para evitar problemas com o produto durante o armazenamento e transporte (GIANNETTI *et al.*, 2019).

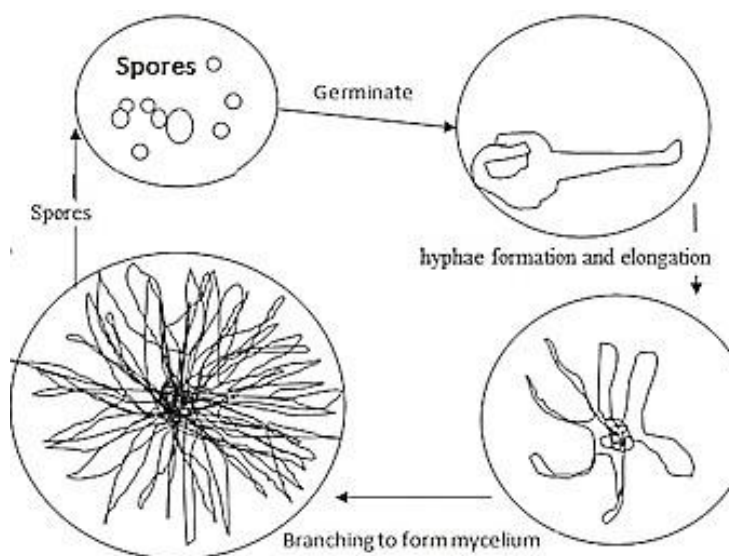
A temperatura é controlada com a utilização de termômetros que se encontram acoplados ao sistema de resfriamento com controlador de temperatura (ALBANESE *et al.*, 2017). Por sua vez, a densidade relativa compara a densidade da cerveja com a da água que tem densidade aproximada de 1 g/cm³ e deve estar em torno de 1,013 a 1,017 g/mL (GONÇALVES *et al.*, 2022). A análise de sólidos totais consiste em evaporar todo o líquido volátil e realizar a pesagem do resíduo seco, para determinar o teor de sólidos existentes na amostra de cerveja, em que o padrão de valores encontrados deve estar na faixa de 2 a 7% (ALMEIDA; BELO, 2017).

A análise da cor no processo de produção é um importante, pois mudanças de cor significam também mudanças no sabor da cerveja. Destaca-se, também, a determinação da acidez titulável que indica a qualidade das matérias-primas e da atividade biológica da levedura, na faixa de 2.84–3.50 (GORZELANY *et al.*, 2022) bem como o pH que deve estar na faixa entre 3,8 – 4,7 (GASIŃSKI *et al.*, 2020) e se relaciona possíveis contaminações, quando não atende à essa recomendação, pois os patógenos de origem alimentar crescem em pH acima de 4,7 (SPEDDING, 2017).

2.5 *Aspergillus flavus* E AFLATOXINAS

O *Aspergillus* é um gênero de fungo filamentoso, estritamente aeróbios, cosmopolitas, do filo *Ascomycota*, família *Trichocomaceae*, que ficam dispersos no solo e liberam os conídios, a forma infectante (AMORIM *et al.*, 2004). Crescem em ambientes ricos em oxigênio e substratos que contém grandes quantidades de carbono, como a glicose (WOODCOCK *et al.* 2006; DILLON *et al.*, 2007). Seu ciclo de vida envolve a formação e liberação de esporos (1), germinação (2), formação e alongamento das hifas (3), crescimento das ramificações que formam o micélio (4), conforme ilustrado na figura 2:

Figura 2 – Ciclo de vida do *Aspergillus*



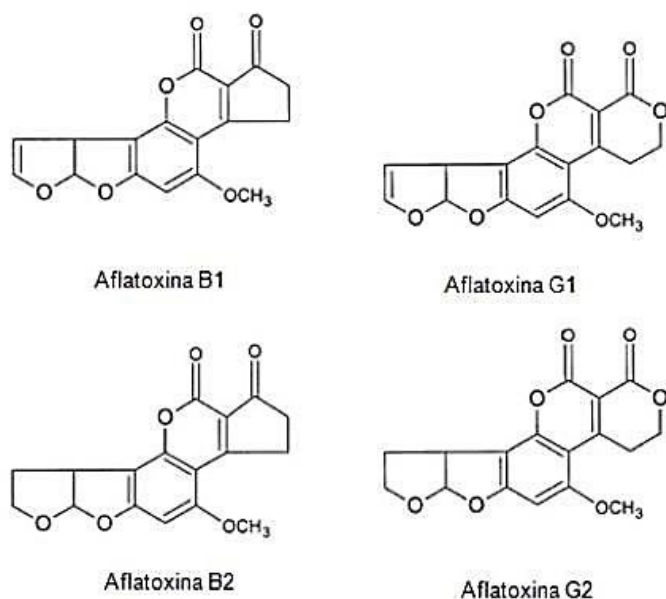
Fonte: Microscope Master (2021)

Por estarem presentes nesses ambientes, atingem vegetais ou matéria orgânica em decomposição e são responsáveis pela produção de micotoxinas (LOGRIECO *et al.*, 2009; MEDINA *et al.*, 2006). Possui mais de 900 espécies, divididas em - 7 subgêneros e 18 seções (Conforme as regras do Código Internacional de Nomenclatura Botânica) de acordo com a morfologia, em que 12 dessas causam doenças em seres humanos, destacando-se as espécies *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* (BENNET; PAPA, 1988).

O gênero *Aspergillus*, pertencente à família *Trichocomaceae* pode produzir 18 tipos diferentes de aflatoxinas (MARUME *et al.*, 2020). A seção *A. flavus*, também possui algumas características específicas, como as morfológicas, que incluem: colônias granulares, planas, geralmente com sulcos radiais, amarelas no início, mudando ligeiramente para um tom verde-amarelado (HEDAYATI *et al.*, 2007; WILSON; PLUNKET, 2020). O *A. flavus* é responsável pela produção da aflatoxina B₁ (AFB₁) e B₂ (AFB₂), sendo esta espécie um fungo que foi reconhecido pela primeira vez por causar aflatoxicose em animais domésticos e é a mais importante produtora de aflatoxina em alimentos. Outro importante produtor de aflatoxina é o *A. parasiticus* responsável por produzir a aflatoxina G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂) (WHO, 2017).

Em relação a estrutura química, as aflatoxinas possuem o núcleo cumarínico, com dois anéis de seis membros ligados a uma estrutura bi-furanóide, e um grupo éter. As aflatoxinas do grupo B apresentam anel ciclopentona na molécula, enquanto os do grupo G apresentam um anel lactona como representado na Figura 3 (ALILOU; AMIRZEHNI; ESLAMI, 2021).

Figura 3 – Estrutura química das Aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂



Fonte: Adaptado de Souto *et al.* (2017)

A. flavus são produtores de aflatoxinas (AFs) e foram isolados de várias culturas, incluindo grãos de trigo (SCHABO *et al.*, 2020b). Esta espécie produtora de AFB₁ e AFB₂, afeta muitas commodities, sendo a AFB₁ presente com mais frequência em amostras contaminadas e considerada a mais tóxica das micotoxinas produzidas por fungos. As AFG₁ e AFG₂ estão associadas principalmente ao amendoim, mas também pode ocorrer em milho, figo e pistache (WHO, 2017).

De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) a AFB₁ é considerada como carcinógeno humano e foi classificada como uma toxina de classe 1 (SCHABO *et al.*, 2020b). A AFB₁ é uma toxina que está presente como contaminante nos produtos agrícolas, como o milho, ervilha, amendoim, trigo, cevada, dentre outros, e representa uma ameaça alimentar tanto para seres humanos quanto para os animais (ZHAO *et al.*, 2021). Sua toxicidade representa um impacto negativo como fonte alimentar de animais de produção (aves, bovinos, suínos e peixes), em que a ingestão leva a mortalidade quando ingerem alimentos contendo essa toxina (ZYCHOWSKI *et al.*, 2013) dependendo da concentração das aflatoxinas (MATEJOVA *et al.*, 2017).

Cerca de 80% da absorção de AFB₁ ocorre no trato gastrointestinal proximal na veia por transporte passivo e a metabolização ocorre no fígado em duas fases (fase I e II) pelas enzimas do citocromo P450 (CYP) (principalmente por CYP1A2 e CYP3A4) (GAO, 2021; SRIWATTANAPONG, 2017). Na fase I, ocorre a transformação da AFB₁ no composto exo-AFB₁-8,9-epoxide (AFBO), catalisado pelo complexo CYP450 (e suas isoenzimas (hemoproteínas localizadas no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias). Na fase II o

composto formado se liga ao DNA, causando danos celulares ou se liga a enzima catalisando a conjugação com glutathione GSH (DENG *et al.*, 2018). A eliminação do composto bioativado (8,9-epóxido) da aflatoxina B₁, pela urina, fezes ou bile, pode ocorrer quando esse sofre conjugação enzimática com uma molécula de glutathione reduzida (BUSZEWSKA-FORAJTA, 2020; FERREIRA *et al.*, 2019).

2.6 CONTAMINAÇÃO POR AFLATOXINAS EM CERVEJAS ARTESANAIS

As micotoxinas produzidas pelos fungos presentes nos solos podem contaminar uma série de alimentos, como cereais, frutas, vegetais, especiarias, dentre outros. São 18 tipos diferentes de aflatoxinas, sendo os principais: aflatoxina B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁), G₂ (AFG₂), M₁ (AFM₁) e M₂ (AFM₂) (MARUME *et al.*, 2020). As AFs supracitadas são consideradas as mais importantes devido ao potencial carcinogênico genotóxico, estando entre substâncias carcinogênicas consideradas mais potentes, podendo induzir a diversos tipos de câncer como o de fígado (JECFA, 2017).

De acordo com dados do relatório da *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2017), cereais e nozes estão no topo de produtos que são considerados fonte de exposição às AFs, com destaque para a AFB₁, em que o trigo está entre os grãos que representam mais de 10% da exposição global a essas micotoxinas (WHO, 2017). A contaminação por fungos toxigênicos dos grãos como trigo e cevada, pode ocorrer no campo ou durante o armazenamento e as micotoxinas podem ser produzidas em condições favoráveis, como umidade (SCHABO *et al.*, 2020a). Estudos têm sido cada vez mais frequentes para determinar as melhores condições de utilização desse grão como adjuvante na fabricação de cerveja, além da qualidade microbiológica quanto a presença de microrganismos (BIANCO *et al.*, 2019).

A cevada e o trigo são, portanto, as duas principais matérias primas utilizadas para a produção de cerveja. A associação desses grãos à presença de micotoxinas torna-se preocupante, o que levou a um grande número de estudos voltados para a determinação da estabilidade desses fungos durante o processo de produção da cerveja, em que ocorre uma transferência dessa substância para a cerveja (PEREIRA; FERNANDES; CUNHA, 2014).

A contaminação por aflatoxinas em cervejas artesanais, pode ocorrer durante diferentes etapas da produção, devido a condições incorretas de secagem, armazenamento e embalagem. Os fungos presentes nos grãos de produção da cerveja podem ser divididos em dois momentos: antes da colheita, em que se destaca a presença de *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium* e *Helminthosporium*; e os que se desenvolvem durante o

armazenamento, que inclui os do gênero *Aspergillus* e, em menor grau, *Penicillium* (KLIMCZAK; CIOCH-SKONECZNY, 2020).

A presença dos fungos não garante que estes estejam contaminados com micotoxinas, assim como a ausência não garante que o grão está livre da micotoxina. A estabilidade de cada uma das formas é diferente, o que pode levar a eliminação do fungo em etapas de aquecimento, enquanto a micotoxina, por exemplo, sobrevive a temperaturas elevadas (BAUER *et al.*, 2016).

Nesse sentido, pode-se afirmar que AFB₁ e AFB₂ presentes nos grãos maltados permanecerão no produto final, pois a temperatura de aquecimento do mosto não atinge valores acima de 100 °C, enquanto essas toxinas são termoresistentes e são destruídas em temperaturas acima de 120 °C (ARZANDEH; JINAP, 2011; RATERS; MATISSEK, 2008; PASCARI *et al.*, 2018). Schabo *et al.* (2020a) investigou os níveis de AFB₁ produzidos no grão de trigo durante a malteação para a produção de cerveja artesanal de trigo, em que foi observado um aumento no nível de AFB₁ com o aumento da temperatura ou tempo de germinação

A contaminação da matéria-prima pode levar a produção da AFB₁ durante a malteação, que oferece condições favoráveis a produção de micotoxinas, e posteriormente ser transferida para a cerveja. As AFs podem ser transferidas para as cervejas devido à alta estabilidade térmica, pois a toxina é estável em temperaturas acima de 40 °C, resistindo as etapas de aquecimento (SCHABO *et al.*, 2020a).

Alguns estudos buscam reportar a incidência de aflatoxinas (AFs) em cerveja artesanal nos últimos anos. Com o objetivo de avaliar a produção e estabilidade de AFB₁ e AFB₂ durante as etapas utilizadas na produção da cerveja artesanal, Schabo *et al.* (2020a) inocularam *A. flavus* em grãos de trigo utilizados na produção da cerveja artesanal. Como resultado, os autores observaram que as condições padrão de maltagem permitiram a produção de AFB₁ e AFB₂ durante as etapas de maceração e secagem mesmo observadas diminuições nos níveis de AFB₁. Os autores observaram ainda que as AFs estavam presentes no malte de trigo em concentrações superiores às aceito pela União Européia em produtos derivados de cereais, na *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em alimentos e na Legislação Brasileira em cereais ou seus produtos derivados. Indicando a partir do estudo, que as condições típicas de malte de cerveja artesanal podem permitir uma produção significativa de aflatoxina se os grãos estiverem contaminados com *A. flavus* aflatoxigênico, e trazendo um alerta para a potencial contaminação de cervejas artesanais.

Em um segundo estudo conduzido também por Schabo *et al.* (2020b), foi investigado a produção de AFB₁ por *A. flavus* durante a maltagem sob todas as combinações de grau de maceração dos grãos, temperatura e tempo de germinação. Os autores verificaram que os níveis

de AFB₁ detectados em todas as amostras de malte de trigo estavam acima dos limites estabelecidos pelas agências reguladoras para cereais e produtos derivados. O modelo de regressão aplicado no estudo permitiu mostrar que o aumento da temperatura e do tempo de germinação resultou em aumento dos níveis de AFB₁ no malte de trigo. Dessa forma, os autores concluíram que o grau de maceração não afetou significativamente os níveis de AFB₁ no malte de trigo dentro da faixa de condições testadas e que as espécies aflatoxigênicas de *A. flavus* podem contaminar os grãos de trigo para uso em maltagem para cerveja artesanal.

Em um estudo posterior, Schabo *et al.* (2021), compilaram informações sobre as micotoxinas detectadas nas matérias-primas utilizadas para a cerveja artesanal, além de informações sobre a produção e o destino desses compostos durante a fabricação de cerveja. Os autores supracitados verificaram que embora os níveis detectados no produto final sejam geralmente menores quando comparados com a matéria-prima, seu destino durante o processamento ou transformação em outros compostos devem ser mais investigados para avaliar os riscos de micotoxinas totais e auxiliar no estabelecimento de limites máximos toleráveis de micotoxinas em cervejas por agências governamentais, além de contribuir com estratégias para descarte ou aproveitamento dos resíduos sólidos da fabricação da cerveja. Por fim, os autores concluíram que a partir de boas estratégias de mitigação agrícola e pós-colheita (secagem rápida e adequada, controle de insetos pós-colheita, transporte e embalagem adequados, boas condições de armazenamento, uso de agentes naturais e químicos e irradiação) se poderia chegar ao controle das micotoxinas em cereais.

2.6.1 Métodos de determinação e extração das aflatoxinas em cervejas

O desenvolvimento de procedimentos analíticos visando a sua quantificação nessas amostras foi impulsionado pela exigência de detecção de micotoxinas em alimentos e rações. A cromatografia em camada fina (CCF) foi a primeira tecnologia relativamente fácil e barata descoberta; infelizmente, tinha baixa sensibilidade e era difícil de automatizar (CHAUHAN *et al.*, 2016). Em um breve levantamento acerca dos métodos de determinação de aflatoxinas, foram encontrados métodos envolvendo biosensores optoeletrônicos (PAGKALI *et al.*, 2018), sensor óptico multicomutado (MOLINA-GARCÍA; FERNANDEZ-DE-CÓRDOVA; MEDINA, 2012), cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (TAHER *et al.*, 2013), cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (ROCHA *et al.*, 2022) e cromatografia líquida bidimensional multi-corte usando ionização por eletrospray (CAMPONE *et al.*, 2020).

Pagkali *et al.* (2018) realizaram a determinação simultânea de três micotoxinas, desoxinivalenol (DON), fumonisina B₁ (FB₁) e aflatoxina B₁ (AFB₁) por meio de um biossensor óptico sem rótulo em amostras de cerveja. O biossensor apresentado pelos autores é composto por dez fontes de luz de silício de banda larga monoliticamente integradas e uma matriz de dez interferômetros Mach-Zehnder (MZIs), e os braços de detecção de MZIs individuais são funcionalizados com conjugados de micotoxina-proteína para permitir a determinação de múltiplos analitos (PAGKALI *et al.*, 2018).

Em outro estudo, foi quantificado usando um sistema de espectroscopia de fase sólida de injeção de fluxo multicomutado (FI-SPS) acoplado com fluorescência induzida fotoquimicamente (PIF). Ao expor um material à luz ultravioleta, um produto de degradação brilhantemente fluorescente foi produzido on-line. O método proposto foi utilizado com sucesso para identificar AFB₁ em diversas variedades de cerveja (normal e não alcoólica). As amostras de cerveja foram despojadas de componentes hidrofóbicos e a AFB₁ foi então extraída com acetonitrila usando extração em fase sólida usando sorvente C₁₈. (MOLINA-GARCÍA; FERNANDEZ-DE-CÓRDOVA; MEDINA, 2012).

A capacidade das tecnologias HPLC acoplado a espectrometria de massa (LC-MS/MS) de identificar uma variedade de compostos em matrizes complicadas com alta sensibilidade é seu principal benefício. Taher *et al.* (2013) utilizou a cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem para determinar micotoxinas em cerveja e a cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC), com duração analítica de cerca de 10 minutos, foi usada para obter a separação. O monitoramento dinâmico de múltiplas reações (MRM) no modo de ionização por eletrospray positivo foi usado para identificar micotoxinas. Antes da análise LC-MS/MS, micotoxinas rotuladas com ¹³C uniformemente foram adicionadas aos extratos da amostra para levar em conta os efeitos da matriz.

Recentemente, o método de método de cromatografia líquida bidimensional multidimensional e espectrometria de massa em tandem e a abordagem foi baseada na tecnologia 2D-HPLC (cromatografia líquida bidimensional). A agilidade e a automação completa do processo analítico, que minimiza a necessidade de operações humanas, são os benefícios agregados à essa tecnologia. Comparando o método desenvolvido com a metodologia unidimensional, os autores defendem que os interferentes foram significativamente reduzidos, juntamente com o fenômeno do efeito matriz (CAMPONE *et al.*, 2020).

Em outro estudo, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção de fluorescência foi utilizado para determinar a presença de aflatoxinas (B₁, B₂, G₁ e G₂) em 60

amostras de cervejas. Os autores utilizaram colunas de imunoafinidade para realizar a extração e determinaram que a técnica apresentou sensibilidade dentro das diretrizes e que a maioria das amostras apresentou pelo menos um tipo de aflatoxina em nível de traço (ROCHA *et al.*, 2022).

Em relação aos métodos de extração, Garcia *et al.* (2018) afirmam que a dispersão em fase sólida de matriz (MSPD) é realizada quando uma pequena quantidade de amostra e suporte sólido são misturados homogeneamente, e o pó resultante é posteriormente eluído com um solvente. Este método minimiza o custo e a duração da análise ao realizar a preparação e limpeza da amostra na mesma etapa, utilizando pequenos volumes de suporte sólido e solvente. As características do suporte sólido, a relação amostra/sólido, os solventes, a relação amostra/solvente, bem como a concentração e as características químicas dos analitos influenciam a eficiência e a seletividade do processo de extração.

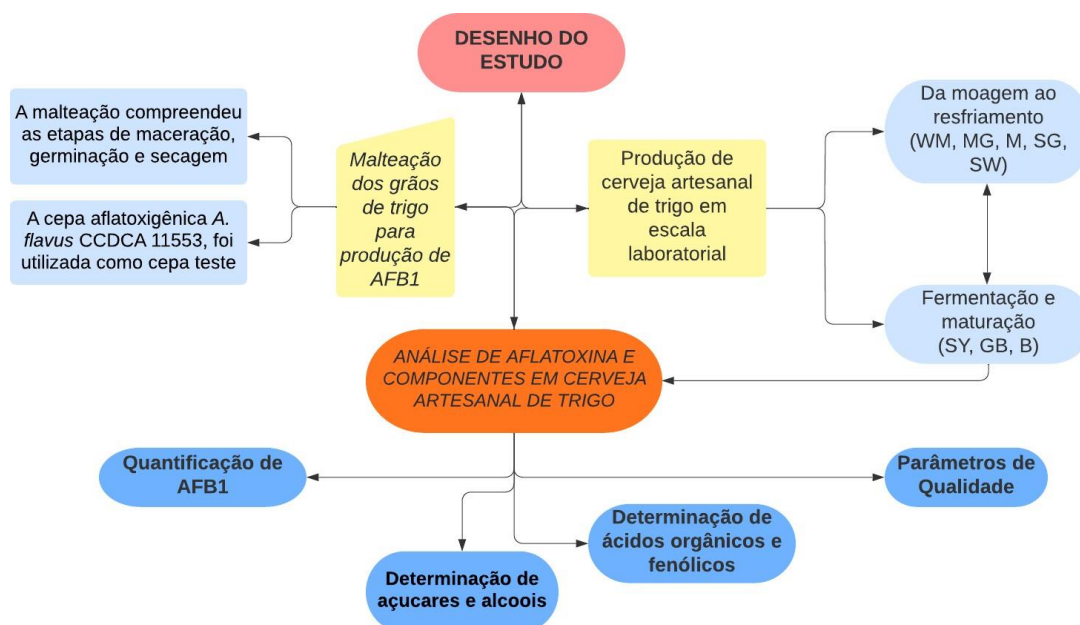
Lago *et al.* (2020) introduz QuEChERS-LC-QTOFMS para a determinação simultânea de micotoxinas para determinação de micotoxinas em cevada maltada. QuEChERS (Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto e Seguro, do inglês Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) envolve a limpeza do extrato com extração dispersiva em fase sólida e partição líquido-líquido com solvente (d-SPE). Este método tem sido utilizado na análise de contaminantes de alimentos porque é simples, requer poucas etapas e remove efetivamente as substâncias interferentes das amostras. Os autores destacam que o método demonstrou forte desempenho analítico, mostrando linearidade, precisão adequada, alta exatidão e sensibilidade suficiente para identificar micotoxinas de acordo com a legislação e várias recomendações de validação de técnicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO

O fluxograma da figura 4 mostra o desenho metodológico empregado para a realização deste trabalho:

Figura 4 – Diagrama das etapas experimentais do estudo



Fonte: Elaborado pela autora (2022)

3.2 MATÉRIA-PRIMA

Os grãos de trigo (*Triticum aestivum* L.), aproximadamente 1 kg, foram adquiridos em uma loja de insumos para cervejeiros localizada na cidade de João Pessoa, estado da Paraíba, Brasil. Todas as amostras utilizadas foram avaliadas, conforme os procedimentos descritos no item 3.3.3 e não foram identificadas quaisquer micotoxinas.

3.2.1 Malteação experimental dos grãos de trigo para produção de AFB₁

Para a produção de AFB₁ durante malteação a cepa aflatoxigênica *A. flavus* CCDCA 11553, pertencente à Coleção de Culturas de Microrganismos do Departamento de Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Lavras, CCDCA/WDCM1081, originalmente isolada de

grãos de trigo usados na produção de cerveja artesanal foi utilizada como cepa teste. A cepa *A. flavus* CCDCA 11553, mantida em sílica gel a 4 °C foi reativada por meio de inoculação dos grânulos de sílica contaminados na superfície do ágar extrato de malte (MEA) com posterior incubação a 25 °C por 7 dias. A cepa foi cultivada em MEA a 25 °C por 7 dias para permitir a esporulação. Os esporos foram coletados por raspagem com uma mistura de água destilada estéril e 0,1% de Tween 80. A suspensão (~10 mL) foi filtrada através de gaze tripla e o número de esporos foi filtrado através de gaze tripla e os esporos enumerados usando câmara de Neubauer. O inóculo (~10⁶ esporos/mL) foi obtido a partir da mistura de 100 mL da suspensão com 900 mL de água destilada esterilizada.

A malteação dos grãos de trigo foi conduzida seguindo as condições propostas de acordo com o procedimento padrão de maltagem proposto pela *Central European Commission of Brewing Analysis* (MEBAK) para fabricação de cerveja conforme descrito por Schabo *et al.* (2020). A contaminação artificial foi realizada pela adição da suspensão de esporos de *A. flavus* CCDCA 11553 (10⁶ esporos/mL) aos grãos de trigo previamente desinfetados por imersão em hipoclorito de sódio a 1% durante 10 minutos e lavados duas vezes com água destilada estéril.

A malteação compreendeu as etapas de maceração, germinação e secagem (MEBAK, 2017). Para a maceração, os grãos de trigo desinfetados foram imersos no inóculo por 5 h, aerados durante 19 h, novamente imersos em água destilada esterilizada por 4 h, e finalmente aerados por 20 h adicionais (grau de maceração de 45% nos grãos). Para que a umidade fosse mantida, o processo envolveu a pulverização dos grãos de trigo com água destilada esterilizada, a cada 12 horas.

Na sequência, foi conduzida a germinação durante quatro dias em estufa tipo BOD (Caltech, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil) com condições controladas de 14,5 ± 0,5 °C e 95-98% de umidade relativa. Os grãos foram virados a cada 12 h para promover aeração e a umidade foi mantida com a pulverização de água destilada esterilizada. Após essa etapa, os grãos inoculados germinados (malte verde) foram submetidos a secagem em rampa iniciando com 16 h a 50 °C, seguida de 1 h a 60 °C, 1 h a 70 °C e por fim 5 h a 80 °C. Posteriormente, o malte de trigo foi retirado da estufa, deixados a temperatura ambiente e as radículas foram removidas do malte manualmente.

3.3 PRODUÇÃO DA CERVEJA ARTESANAL DE TRIGO EM ESCALA LABORATORIAL

O malte de cevada e de trigo, lúpulo e levedura para a produção da cerveja artesanal de trigo foram adquiridos em lojas especializadas na venda de insumos para fabricação de cerveja, na cidade de João Pessoa, estado da Paraíba, Brasil. As amostras de malte foram confirmadas como livres de AFB₁, de acordo com o procedimento descrito por Schabo *et al.* (2020). As etapas de produção da cerveja compreenderam a moagem, mosturação, filtração, fervura, fermentação e maturação conforme descrito no quadro 3.

Quadro 3– Descrição das etapas da produção da cerveja e código correspondente.

Código da amostra	Amostra	Composição	Etapa do processo de produção de cerveja
WM	Malte de trigo	Malte de trigo contaminado com AFB ₁	Matéria-prima
MG	Malte moído	Malte de trigo contaminado com AFB ₁ e malte de cevada livre de micotoxinas moídos	Moagem
M	Mosto	Maltes moídos adicionados de água e após a mosturação (43 °C, 52 °C, 66 °C e 78 °C)	Mosturação
SG	Grãos gastos	Grãos após a filtração do mosto	Filtração
SW	Mosto doce	Mosto após descarte dos grãos filtrados	Fervura
GB	Cerveja verde	Mosto lupulado, resfriado e adicionado de levedura	Fermentação
SY	Levedura de descarte	Levedura decantada e descartada (<i>trub</i>)	Maturação
B	Cerveja	Cerveja maturada	Maturação

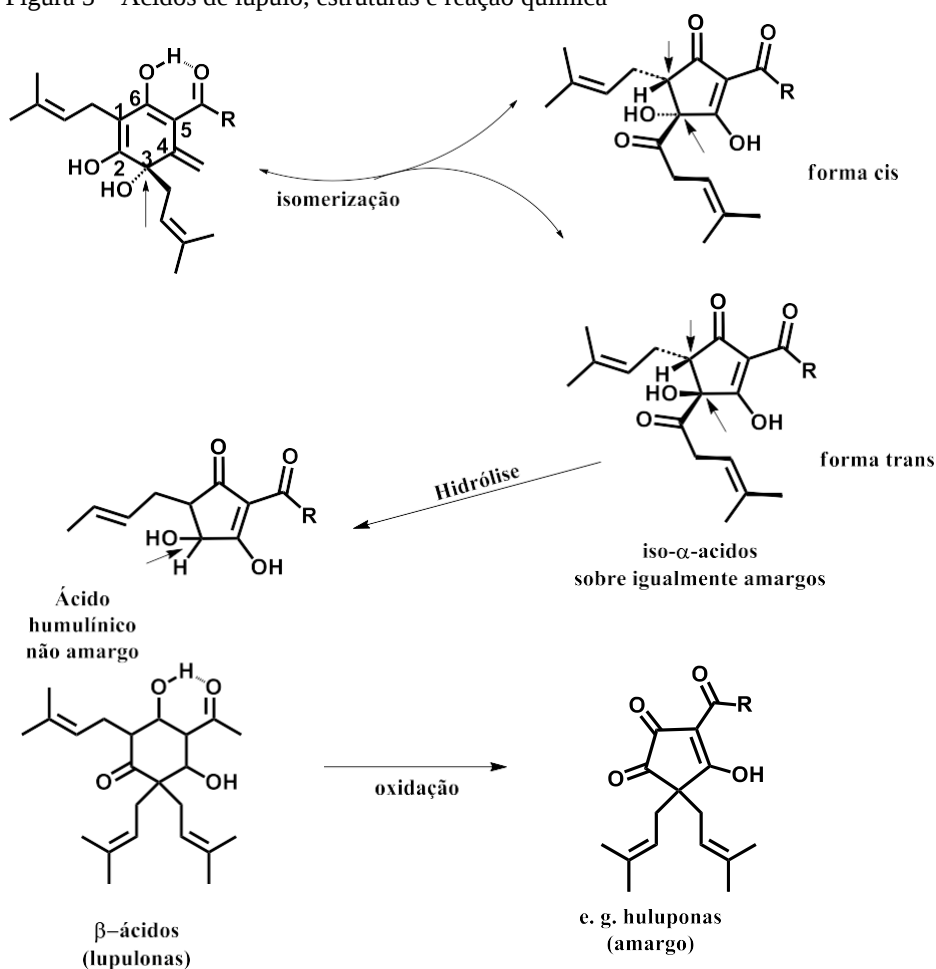
3.3.1 Da moagem ao resfriamento

Na etapa de moagem o malte de trigo contaminado com AFB₁ (WM; 450 g) e o malte de cevada isento de micotoxinas (450 g) foram moídos em um moinho de laboratório, com distância ajustada entre os cilindros de britagem de 1,8 mm, para obter um tamanho de partícula desejável e expor o amido contido no seu interior. Em seguida os maltes moídos foram misturados (MG; 900 g) e adicionados de 3 L de água a 45 °C, em com agitação constante (PAIX, 2019). A temperatura de infusão caiu para 43 °C e o mosto foi mantido em repouso nesta temperatura por 15 min. Na sequência, a temperatura foi elevada para 52 °C sob agitação intensa e o mosto permaneceu em repouso nessa temperatura por 20 min. Decorrido este tempo, a temperatura foi aumentada para 66 °C sob agitação constante e o mosto foi deixado em

repouso por 40 min (MATSUBARA, 2014). Por fim, a temperatura foi elevada a 78 °C, na qual o mosto foi mantido por 5 minutos para desativar as enzimas (*mashout*) (MATSUBARA, 2014; PAIX, 2019). O procedimento de mosturação foi concluído quando o teste de iodo deu negativo, isto é, quando todo o amido presente no mosto foi convertido em açúcares pelas enzimas, e a amostra coletada (M).

Após a mosturação foi realizada a filtração/clarificação do mosto para separar a fase líquida do mosto do bagaço do malte com o objetivo de extrair o máximo possível de açúcar do sólido. Nesta técnica, água aquecida (80 °C) é adicionada aos grãos gastos (SG) enquanto o mosto livre de sólidos e sedimentos é filtrado. Depois da filtração do mosto, foi realizada a fervura e lupulagem do mosto com o objetivo de esterilizar o mosto, isomerizar as substâncias amargas do lúpulo (Figura 5), evaporar substâncias voláteis indesejadas e concentrar o mosto. O mosto doce (SW) filtrado foi aquecido lentamente até seu ponto de ebulição (1 °C/min), com mistura contínua (WUNDERLICH; BACK, 2009; HOUGH *et al.*, 2012). Quando a temperatura do mosto atingiu 100 °C (~10 min), 1 g de lúpulo Bart Haas Hallertau Magnum (LNF, Alemanha, 2021) Magnum (11-16% de alfa ácidos) foi adicionado e o mosto lupulado foi fervido por 50 minutos (PAIX, 2019; TÓFOLI, 2014), totalizando 60 min na etapa de fervura. Nesta etapa ainda ocorre a redução do pH, reação de Maillard com aumento da coloração do mosto e formação do *Trub* com coagulação de proteínas que decantam no fundo do recipiente de fervura junto com os restos dos lúpulos utilizados.

Figura 5 – Ácidos de lúpulo, estruturas e reação química



$R = \text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ isovaleril = humulona (lupulona)
 $R = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ isobutirilo = cohumulona (colupulona)
 $R = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$ 2-metil-butirilo = adhumulona (adlupulona)

Pequenas quantidades de outros isômeros estão presentes

Fonte: Adaptado de Lewis; Young (2001)

Em seguida, foi realizado o resfriamento com o objetivo de separar o *Trub* e adequar a temperatura. Na separação do *Trub* ocorre a precipitação do resto de lúpulo e de proteínas. Durante o resfriamento esse material sólido decanta e, através do *whirlpool*, uma técnica que funciona a partir da agitação do mosto em movimentos circulares para concentrar esse material no centro do recipiente para depois ser separado do mosto. Em seguida, o mosto foi resfriado até a temperatura de fermentação (21 °C), ideal para inocular o fermento. Após o resfriamento do mosto lupulado, a densidade original (OG, *original gravity*) foi medida, conforme 3.5, para verificar a quantidade de açúcares, antes da fermentação, que irão influenciar no teor alcoólico da cerveja. A OG da receita pode ser corrigida neste momento, porém essa correção não foi necessária.

3.3.2 Fermentação e maturação

O mosto resfriado (21 °C) foi transferido para um fermentador cilíndrico cônico fechado para impedir a entrada de oxigênio, porém com um local de escape para o gás carbônico gerado. O mosto foi inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* (WB-6; 10⁶ UFC/mL) e deixado em repouso durante oito dias, em temperatura controlada (21 °C). Durante a fermentação a densidade relativa (SG; *specific gravity*) foi medida, a cada 24 h, para verificar a relação entre a densidade de açúcares e a densidade da água, até que a densidade se manteve constante. A densidade final (FG; *final gravity*) é a quantidade de açúcares após a fermentação e quando constante significa que o trabalho da levedura cessou e a fermentação parou. A medição da SG e da FG também foram medidas conforme 3.4.

Decorridos os 8 dias de fermentação, as leveduras depositadas no fundo do fermentador foram retiradas (SY) e o líquido, denominado cerveja verde (GB), foi mantido à 0 °C por cinco dias para maturação. Durante a maturação as leveduras restantes na cerveja metabolizam certos compostos amenizando ou até eliminando *off-flavors*. A maturação ajuda o processo de decantação das leveduras ainda restantes do processo fermentativo, bem como auxilia a remoção de outros compostos turvulentos, como polifenóis e proteínas, clarificando a cerveja (B) (PAIX, 2019).

3.3.3 Quantificação de AFB₁ nas etapas de produção de cerveja

Amostras isentas de micotoxinas detectáveis foram utilizadas para o desenvolvimento e validação do método de detecção de aflatoxina B₁. A determinação dos níveis de AFB₁ foram realizadas nas etapas descritas na Tabela 1. Para identificar e quantificar a AFB₁, foram coletadas amostras de aproximadamente 50 mL (amostras líquidas; Sweet Wort - SW, Green Beer - GB, Spent Yeast - SY, Beer - B) ou 50 g (amostras sólidas; Wheat Malt - WM, Malt Grist - MG; Mash - M, Spent Grains - SG). A extração de AFB₁ foi realizada utilizando a técnica de extração por partição líquido-líquido (PLL), e dispersão em fase sólida assistida por vórtex (MSPD). A técnica PLL foi validada por Garcia et al (2020) e a técnica MSPD foi validada por Massarolo et al (2018).

Para identificação e quantificação das micotoxinas foi utilizado a Cromatografia líquida de alta performance (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) com detector de fluorescência – HPLC-FL (Shimadzu LC-10VP), acoplado com derivativador físico-químico pós coluna, para excitação do analito com luz UV (254 nm) (Romer Derivatization Unit

RDU™). O sistema é associado a um reator eletroquímico Kobracell (R-Biopharm, Alemanha) conectado a uma corrente (100 μ A) para derivatização pós-coluna de AFB₁. A coluna (Phenomenex CHROM-CLONE) possui fase estacionária C18, 5 μ m, 150 x 4,6 mm. O agente de eluição utilizado foi acetonitrila: água (9:1 v/v), com fluxo de 1 mL/min, temperatura de 40 °C e detector de fluorescência (com 365 nm e 440 nm, excitação e emissão, respectivamente).

O processo de extração PLL foi realizada pela adição de uma alíquota de 2 mL de amostra em tubo Falcon (15 mL) e, em seguida, adicionado 1 mL de clorofórmio (P.A. ACS/ISO 1.000 mL; 99,8%). A mistura foi agitada em vórtex durante 3 minutos e adicionado mais 1 mL de clorofórmio à mistura. A mesma retornou à agitação por 3 minutos, seguidos da adição de 1 mL da solução de cloreto de potássio (KCl - 2% m/v). A nova mistura foi agitada por 1 minuto e mantida a temperatura de -10 °C por 10 min.

Após esse procedimento, procedeu-se centrifugação a 5800 x g por 10 min a 4 °C. O volume de 1 mL da fase orgânica separada na centrífuga foi transferido para um frasco âmbar e o solvente foi evaporado por aquecimento em banho de areia (50 °C) até a total evaporação.

A ressuspensão do sedimento foi realizada em 1 mL da fase móvel acetonitrila:água 9:1 (v/v). As amostras que apresentaram turbidez foram filtradas em filtro de nylon (0,45 μ m). A solução contendo a amostra e a fase móvel foi injetada em HPLC-FL. As amostras foram quantificadas em relação ao tempo de retenção em coluna usando a curva padrão em extrato de matriz.

A extração por meio de MSPD foi realizada utilizando-se 1 g da amostra homogeneizada e 0,5 g de suporte sólido (C₁₈) transferidas ao almofariz. A mistura foi macerada com um pistilo durante 5 min, para o alcance de granulometria aparentemente uniforme. A mistura sólida foi transferida para o tubo Falcon e 10 mL da mistura metanol:acetonitrila 1:1 (v/v) foram adicionados. A mistura foi agitada em vórtex por 3 minutos e centrifugada a 5800 x g por 10 min a 4 °C.

O volume de 5 mL do sobrenadante foi transferido para um frasco âmbar e o solvente extrator foi totalmente evaporado em banho de areia (50 °C). O sedimento foi ressuspensionado em 1 mL da fase móvel acetonitrila:água 9:1 (v/v) e as amostras que apresentaram turbidez foram filtradas utilizando filtro de nylon (0,45 μ m).

O extrato foi injetado em HPLC-FL. As amostras foram quantificadas em relação ao tempo de retenção em coluna usando a curva padrão em extrato de matriz, de acordo com o procedimento descrito por Massarolo *et al.* (2018).

Todos os reagentes utilizados possuem grau analítico e a água empregada no preparo da solução de extração e na fase móvel foi obtida por sistema de purificação e filtração Milli-Q de resistividade 18 MW/cm.

Os métodos para determinar as aflas em amostras sólidas e líquidas nas matrizes desse estudo foram validados pela determinação de limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão (recuperação), precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e efeito de matriz, de acordo com as diretrizes da EC (2006) e ANVISA (2003). LOD foi determinado pela relação sinal/ruído no tempo de retenção do padrão. LOQ foi definido como a menor concentração de analito cujo sinal foi detectado com segurança. A recuperação foi determinada em três níveis de concentração (x, y e z ng/mL) sendo a eficiência demonstrada por valores entre 70 e 120% com desvio padrão relativo (RSD) $\leq 20\%$. Para os cálculos das concentrações de aflatoxinas nas amostras analíticas foram utilizadas as áreas de pico nos cromatogramas. Cada nível de fortificação foi extraído em triplicado e injetado três vezes no HPLC nas condições estabelecidas (n = 9).

3.4 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E ÁLCOOIS DURANTE A PRODUÇÃO DA CERVEJA ARTESANAL DE TRIGO

A determinação simultânea dos parâmetros de açúcares e álcoois foram realizadas nas amostras M, SW, GB, e B, utilizando o HPLC com detecção refrativa (RID) seguindo a metodologia de Ball e Lloyd (2011), com modificações. As amostras foram previamente diluídas em água ultrapura, filtrada através de uma membrana de nylon de 0,45 μm e injetadas (10 μL). O fluxo de solvente foi de 0,8 mL/min. Foi utilizada uma coluna de troca iônica Agilent Hi-Plex H (7,7 x 300 mm, 8 μm) protegida por uma pré-coluna PL Hi-Plex H (5 x 3 mm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O tempo de eluição durou 20 minutos (T = 60 °C) e a fase móvel de 0,004 mol/L H₂SO₄.

Todos os dados foram processados no software *OpenLAB CDS ChemStation Edition* (Agilent Technologies, Santa Clara - EUA) e a identificação e quantificação feita por comparação com padrões externos.

3.5 DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS E FENÓLICOS DURANTE A PRODUÇÃO DA CERVEJA ARTESANAL DE TRIGO

Os ácidos orgânicos e fenólicos foram identificados nas amostras M, SW, GB, e B, e a determinação foi realizada por meio de um cromatógrafo líquido *Agilent 1260 Infinity LC System* (*Agilent Technologies*, Santa Clara - EUA) acoplado a um detector de arranjo de diodo (DAD) (modelo G1315D), e um RID (detector de índice refrativo) (modelo G1362A).

Para determinação dos compostos fenólicos individuais foi utilizado cromatógrafo RP-HPLC/DAD de acordo com a metodologia de Padilha *et al.* (2018) e adaptada por Dutra *et al.* (2018). Onde, 20 µL de cerveja foram previamente filtrados e injetados através de uma membrana (Millex-HA, Millipore, Badford, MA). A coluna usada foi Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100 × 4,6 mm, 3,5 µm) e a pré-coluna Zorbax C18 (12,6 × 4,6 mm, 5 µm) (Zorbax, EUA).

Todos os dados foram processados no software *OpenLAB CDS ChemStation Edition* (*Agilent Technologies*, Santa Clara - EUA) e a identificação e quantificação feita por comparação com padrões externos.

3.6 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE DURANTE A FERMENTAÇÃO DO MOSTO

As amostras para determinação da densidade foram coletadas no mosto lupulado resfriado para saber a OG e a cada 24 h da fermentação (SG) até que a densidade se manteve constante (FG). As amostras foram avaliadas quanto a densidade utilizando um densímetro (Incoterm®) para massa específica com graduação de 1000 a 1060, em g/mL, calibrado a 20 °C. Para realizar a análise de densidade relativa, foi retirada uma alíquota de 25 mL da primeira etapa do mosto até a amostra final da cerveja após a fermentação. A amostra líquida foi colocada em uma proveta de 250 mL, mediu-se a temperatura e, em seguida, foi adicionado o densímetro de massa específica que ficou livre na amostra, em que a superfície do líquido determinou a escala e, conseqüentemente, a densidade (MARTINS, 2007).

3.7 CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA DURANTE A FERMENTAÇÃO DO MOSTO

As células de levedura foram enumeradas através do uso da câmara de Neubauer. As amostras foram coletadas da levedura hidratada, antes da inoculação no mosto (Y), após 24 h da inoculação (W1) e a cada 48 h até o sétimo dia da fermentação (W2-W4). Como no oitavo dia de fermentação a densidade foi constante confirmando que a fermentação cessou, foi realizada a contagem de leveduras no líquido com leveduras decantada que foi para descarte (SY). Foram realizadas, ao todo, seis contagens, conforme tabela 1.

Tabela 1 – Coleta de amostras para contagem de células de levedura durante a fermentação do mosto.

Código da amostra	Composição da Amostra	Tempo de fermentação
Y	Levedura hidratada	-
W1	Mosto inoculado	24 h
W2	Mosto inoculado	72 h
W3	Mosto inoculado	120 h
W4	Mosto inoculado	168 h
SY	Levedura de descarte	192 h

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

As amostras coletadas foram submetidas a diluição seriada. Alíquotas de 10 µL de cada diluição foram transferidos para cada compartimento da câmara de Neubauer e levados ao microscópio eletrônico (aumento de 400x), onde foi realizada a contagem total das células nos quatro quadrantes das extremidades e no quadrante central.

3.8 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS DE QUALIDADE NO PRODUTO FINAL

A cerveja artesanal elaborada foi avaliada quanto aos parâmetros de pH (Quimis modelo Q400as) e cor (colorímetro Konica Minolta, modelo CR 400). Os sólidos totais também foram determinados de acordo com a metodologia da AOAC (2012).

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As amostras foram analisadas em duplicata. Os resultados relacionados aos níveis de AFB₁ foram expressos como média ± desvio padrão. As diferenças nos níveis de AFB₁ foram analisadas por análise estatística de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey no ambiente estatístico R versão 3.6 (R Core Team, 2019). O nível de confiança para significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os resultados desta tese estão apresentados na forma de um artigo original apresentado no apêndice A.

O artigo apresentado no apêndice A - **WHEAT CRAFT BEER MADE FROM AFB₁ CONTAMINATED WHEAT MALT CONTAINS DETECTABLE MYCOTOXINS, RETAINS BASIC QUALITY PARAMETERS AND DIFFERS IN ETHANOL, SUGAR AND PHENOLIC CONTENT** aborda a quantificação dos teores de AFB₁ nas diferentes etapas da produção da cerveja artesanal de trigo, bem como no produto final elaborado com malte de trigo contaminado. Foram avaliados parâmetros físico-químicos como a densidade, pH, cor e acidez. Foi realizada, além disso, a contagem de leveduras e determinação de açúcares, ácidos orgânicos, álcoois e compostos fenólicos. Por fim, foram verificados os parâmetros de qualidade do produto final, incluindo pH, densidade, cor, extrato seco e acidez. A maltose e a glicose foram os açúcares encontrados em maiores concentrações nas amostras examinadas durante a fabricação da cerveja. O processo de fermentação consumiu maltose, glicose e frutose. Dezenove compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, flavonóides, proantocianidinas, estilbenos, flavononas e flavonóis foram identificados. Em relação a determinação de AFB₁, nossos resultados demonstram que os níveis de AFB₁ variaram ao longo da fabricação de cerveja artesanal de trigo, passando de uma concentração de 1.01 µg/kg no grão de malte para 0.22 µg/L na cerveja final. Essa concentração da amostra de cerveja final encontra-se cerca de 5 vezes acima das permitidas pela legislação brasileira, pela *Food and Drug Administration* dos EUA e pela União Européia para produtos de cereais. O perfil de fenólicos, assim como a os açúcares foram afetados pela presença da aflatoxina, que contribuiu para as alterações percebidas, provavelmente, pelas alterações metabólicas e adsorção durante a fermentação.

REFERÊNCIAS

ACERVA Brasil. Associação dos Cervejeiros Caseiros Artesanais do Brasil. 2021. Disponível em: <https://abracerva.com.br/>. Acesso em: 06 jun. 2021.

ADEYEYE, Samuel Ayofemi Olalekan. Mycotoxins in foods: impact on health. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2022. p. 261-271.

AGRIOPOULOU, Sofia; STAMATELOPOULOU, Eygenia; VARZAKAS, Theodoros. Advances in occurrence, importance, and mycotoxin control strategies: Prevention and detoxification in foods. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 137, 2020.

AL-TAHER, Fadwa *et al.* Rapid method for the determination of multiple mycotoxins in wines and beers by LC-MS/MS using a stable isotope dilution assay. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 10, p. 2378-2384, 2013.

ALBANESE, L.; CIRIMINNA, R.; MENEGUZZO, F.; PAGLIARO, M. Innovative beer-brewing of typical, old and healthy wheat varieties to boost their spreading. **Journal of Cleaner Production**, v. 171, p. 297–311, 2018.

ALBANESE, Lorenzo; CIRIMINNA, R.; MENEGUZZO, F.; PAGLIARO, M. Beer-brewing powered by controlled hydrodynamic cavitation: Theory and real-scale experiments. **Journal of Cleaner Production**, v. 142, p. 1457-1470, 2017.

ALFEO, V.; TODARO, A.; MIGLIORE, G.; BORSELLINO, V.; SCHIMMENTI, E. Microbreweries, brewpubs and beerfirms in the Sicilian craft beer industry. **International Journal of Wine Business Research**, v. 32, n. 1, p. 122–138, 2019.

ALILOU, Sevda; AMIRZEHNI, Maliheh; ESLAMI, Parvin Alizadeh. A simple fluorometric method for rapid screening of aflatoxins after their extraction by magnetic MOF-808/graphene oxide composite and their discrimination by HPLC. **Talanta**, v. 235, p. 122709, 2021.

ALMEIDA, Denner Silva; BELO, Renata França Cassimiro. Análises físico-químicas de cervejas artesanais e industriais comercializadas em Sete Lagoas-MG. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, v. 5, n. 5, 2017.

AMORIM, D. S.; DE-MARIA-MOREIRA, N. L.; DE AMORIM, C. D. R.; SANTOS, S. S.; DE OLIVEIRA, J. M.; NUNES, C. P.; *et al.* Infecções por *Aspergillus* spp: aspectos gerais. **PULMÃO RJ**, v. 13, n. 2, p. 2, 2004.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

AOAC. Association Of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the AOAC International**. 19. ed. Washington: AOAC; 2012.

ARRUDA, Tarsila R.; PINHEIRO, P. F.; SILVA, P. I.; BERNARDES, P. C. Exclusive Raw Material for Beer Production? Addressing Greener Extraction Techniques, the Relevance, and

Prospects of Hops (*Humulus lupulus* L.) for the Food Industry. **Food and Bioprocess Technology**, p. 1-31, 2021.

ARZANDEH, S.; JINAP, S. Effect of initial aflatoxin concentration, heating time and roasting temperature on aflatoxin reduction in contaminated peanuts and process optimisation using response surface modelling. **International journal of food science & technology**, v. 46, n. 3, p. 485-491, 2011.

BALL, S. BULLOCK, S.; LLOYD, L.; MAPP, K.; EWEN, A. Analysis of carbohydrates, alcohols, and organic acids by ion-exchange chromatography. **Agilent Hi-Plex Columns Applications Compendium Agilent Technologies Inc, Santa Clara, CA**, 2011.

BAMFORTH, C. W. Progress in brewing science and beer production. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 8, p. 161-176, 2017.

BAMFORTH, Charles W.; COOK, David J. **Food, fermentation, and micro-organisms**. John Wiley & Sons, 2019.

BAUER, Julia I.; GROSS, M.; GOTTSCHALK, C.; USLEBER, E. Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. **Food Control**, v. 63, p. 135-139, 2016.

BAUMGARTHUBER, Christine. **Fermented Foods: The History and Science of a Microbiological Wonder**. Reaktion Books, 2021.

BENNETT, J. W.; PAPA, K. E. The aflatoxigenic *Aspergillus* spp. **Advances in plant pathology: genetics of plant pathogenic fungi**, v. 6, p. 263-80, 1988.

BIANCO, A.; FANCELLO, F.; BALMAS, V.; DETTORI, M.; MOTRONI, A.; ZARA, G.; BUDRONI, M. Microbial communities and malt quality of durum wheat used in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 125, n. 2, p. 222-229, 2019.

BOUHLAL, O.; AFFRICOT, J. R.; PUGLISI, D.; EL-BAOUCHI, A.; EL OTMANI, F.; KANDIL, M.; *et al.* Malting Quality of ICARDA Elite Winter Barley (*Hordeum vulgare* L.) Germplasm Grown in Moroccan Middle Atlas. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, p. 1-12, 2021.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 6.871, de 14 de junho de 2009. Padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas. **Diário Oficial da União**. Poder executivo, Brasília, DF, 2009.

BRASIL. Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres. Caderno 4: Fermentados Alcoólicos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. Secretaria de Defesa Agropecuária- SDA, Coordenação Geral de Apoio Laboratorial-CGAL, 2010.

BREWER, D.; TEETER, E. **Egypt and the Egyptians**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007.

BREWERS Association. **Craft brewer definition**. 2022 Disponível em: <https://www.brewersassociation.org/statistics-anddata/craft-brewer-definition/>. Acesso em: 03 jan. 2022.

BREWERS Association. National Beer Sales & Production Data. Brewers Association. Craft Beer. Brewers Association, Boulder. Disponível em: <https://www.brewersassociation.org/>. Acesso em: 02 jan. 2022.

BUSZEWSKA-FORAJTA, Magdalena. Mycotoxins, invisible danger of feedstuff with toxic effect on animals. **Toxicon**, v. 182, p. 34-53, 2020.

BYEON, Yang Soo; LIM, S. T.; KIM, H. J.; KWAK, H. S.; KIM, S. S. Quality Characteristics of Wheat Malts with Different Country of Origin and Their Effect on Beer Brewing. **Journal of Food Quality**, v. 2021, 2021.

CABRAS, Ignazio. Craft beers and breweries in the United Kingdom: where now, what next? In: **Case Studies in the Beer Sector**. Woodhead Publishing, 2021. p. 37-48.

CALLEJO, M. J.; TESFAYE, W., GONZÁLEZ, M. C.; MORATA, A. Craft beers: Current situation and future trends. **New Advances on Fermentation Processes**, 2019.

CAMPONE, Luca *et al.* Determination of mycotoxins in beer by multi heart-cutting two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry method. **Food chemistry**, v. 318, p. 126496, 2020.

CAPECE, Angela; ROMANIELLO, R.; PIETRAFESA, A.; SIESTO, G.; PIETRAFESA, R.; ZAMBUTO, M.; ROMANO, P. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. **International journal of food microbiology**, v. 284, p. 22-30, 2018.

CARVALHO, N. B.; MINIM, L. A.; NASCIMENTO, M.; DE CASTRO FERREIRA, G. H.; MINIM, V. P. R. Characterization of the consumer market and motivations for the consumption of craft beer. **British Food Journal**, v. 120, n. 2, p. 378-391, 2018.

DE SIMONE, Nicola; RUSSO, P.; TUFARIELLO, M.; FRAGASSO, M.; SOLIMANDO, M.; CAPOZZI, V.; *et al.* Autochthonous Biological Resources for the Production of Regional Craft Beers: Exploring Possible Contributions of Cereals, Hops, Microbes, and Other Ingredients. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1831, 2021.

DENG, Jiang; ZHAO, L.; ZHANG, N. Y.; KARROW, N. A.; KRUMM, C. S.; QI, D. S.; SUN, L. H. Aflatoxin B1 metabolism: regulation by phase I and II metabolizing enzymes and chemoprotective agents. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 778, p. 79-89, 2018.

DILLON, H. Kenneth; BOLING, D. Keith; MILLER, J. David. Comparison of detection methods for *Aspergillus fumigatus* in environmental air samples in an occupational environment. **Journal of occupational and environmental hygiene**, v. 4, n. 7, p. 509-513, 2007.

DUTRA, M. C. P.; RODRIGUES, L. L.; DE OLIVEIRA, D.; PEREIRA, G. E.; DOS SANTOS LIMA, M. Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe, and, Mn. **Food Chemistry**, v. 269, p. 157- 165, 2018.

EATON, Brian. An Overview of Brewing. **Handbook of Brewing**, p. 53-66, 2017.

EC. European Commission. **Official Journal of the European Communities**, L221/8-36, 17 de Agosto de 2002. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2002:221:FULL&from=EN>. Acesso em: 23 maio. 2022.

EINFALT, Daniel. Barley-sorghum craft beer production with *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima* yeast strains. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 2, p. 385-393, 2021.

ERHARDT, N.; MARTIN-RIOS, C.; BOLTON, J.; LUTH, M. Doing Well by Creating Economic Value through Social Values among Craft Beer Breweries: A Case Study in Responsible Innovation and Growth. **Sustainability**, v. 14, n. 5, p. 2826, 2022.

FALTERMAIER, A.; WATERS, D.; BECKER, T.; ARENDT, E.; GASTL, M. Common wheat (*Triticum aestivum* L.) and its use as a brewing cereal—a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 1, p. 1-15, 2014.

FANARI, M.; FORTESCHI, M.; SANNA, M.; PIU, P. P.; PORCU, M. C.; D'HALLEWIN, G.; SECCHI, N.; ZINELLU, M.; PRETTI, L. Produção de planta piloto de cerveja artesanal de frutas usando purê de frutas tratado com Óhmico. **J. Food Process. Preserv.**, v. 44, p. 1–8, 2020.

FAO/WHO. Evaluation of certain contaminants in food: eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **World Health Organization**, n. 1002, p. 1–166, 2017.

FERREIRA, Roseane Guimaraes; CARDOSO, M. V.; DE SOUZA FURTADO, K. M.; ESPÍNDOLA, K. M. M.; AMORIM, R. P.; MONTEIRO, M. C. Epigenetic alterations caused by aflatoxin b1: a public health risk in the induction of hepatocellular carcinoma. **Translational Research**, v. 204, p. 51-71, 2019.

FLAVIIS, R.; SANTARELLI, V.; MUTARUTWA, D.; GIULIANI, M.; SACCHETTI, G. Volatiles profile of 'Blanche' wheat craft beer as affected by wheat origin: A chemometric study. **Food Chemistry**, v. 385, p. 132696, 2022.

GAO, Yana; BAO, X.; MENG, L.; LIU, H.; WANG, J.; ZHENG, N. Aflatoxin B1 and Aflatoxin M1 Induce Compromised Intestinal Integrity through Clathrin-Mediated Endocytosis. **Toxins**, v. 13, n. 3, p. 184, 2021.

GARCIA, Sabrina De Oliveira; SIBAJA, Karen Vanessa Marimón; NOGUEIRA, Wesclen Vilar; FELTRIN, Ana Carla Penteado; PINHEIRO, Diean Fabiano Alvares; CERQUEIRA, Maristela Barnes Rodrigues; FURLONG, Eliana Badiale; GARDA-BUFFON, Jaqueline. Peroxidase as a simultaneous degradation agent of ochratoxin A and zearalenone applied to model solution and beer. **Food Research International**, v. 131, p. 109039-109050, 2020.

GASIŃSKI, A.; KAWA-RYGIELSKA, J.; SZUMNY, A.; CZUBASZEK, A.; GĄSIOR, J.; PIETRZAK, W. Volatile compounds content, physicochemical parameters, and antioxidant activity of beers with addition of mango fruit (*Mangifera Indica*). **Molecules**, v. 25, n. 13, p. 3033, 2020.

GIANNETTI, V.; MARIANI, M. B.; TORRELLI, P.; MARINI, F. Flavour component analysis by HS-SPME/GC–MS and chemometric modeling to characterize Pilsner-style Lager craft beers. **Microchemical Journal**, v. 149, p. 103991, 2019.

GONÇALVES, J. N.; DE SOUZA, P. G.; BARRETO, E. D. C. M.; DE LIMA, J. S.; DA SILVA, V. B. Elaboração de cerveja artesanal do estilo caxiri beer com adição de camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Brazilian Journal of Science**, v. 1, n. 4, p. 101-108, 2022.

GORZELANY, J.; BELCAR, J.; KUŹNIAR, P.; NIEDBAŁA, G.; PENTOS, K. Modelling of Mechanical Properties of Fresh and Stored Fruit of Large Cranberry Using Multiple Linear Regression and Machine Learning. **Agriculture**, v. 12, n. 2, p. 200, 2022.

GUIDO, Luis F. Brewing and craft beer. **Beverages**, v. 5, n. 3, p. 51, 2019.

HARDWICK, W. (Ed.). **Handbook of brewing**. CRC Press. 1994.

HEDAYATI, M. T.; PASQUALOTTO, A. C.; WARN, P. A.; BOWYER, P.; DENNING, D. W. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, v. 153, n. 6, p. 1677-1692, 2007.

HOLBROOK, C. J. **Brewhouse operations Craft**. Handbook, v. 65, 2020.

HOPFER, Helene; MCDOWELL, E. H.; NIELSEN, L. E.; HAYES, J. E. Preferred beer styles influence both perceptual maps and semantic descriptions of dry hops. **Food Quality and Preference**, v. 94, p. 104337, 2021.

HU, Xiunan; JIN, Yuhong; DU, Jinhua. Differences in protein content and foaming properties of cloudy beers based on wheat malt content. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 125, n. 2, p. 235-241, 2019.

HUMIA, B. V., SANTOS, K. S.; BARBOSA, A. M.; SAWATA, M.; MENDONÇA, M. D. C.; PADILHA, F. F. Beer molecules and its sensory and biological properties: A review. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1568, 2019.

HOUGH, James Shanks *et al.* **Malting and Brewing Science: volume II hopped wort and beer**. Springer, 2012.

IARC - International Agency for Research on Cancer IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 82. Aflatoxins: B1, B2, G1, G2, M1. In: **Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene, and Styrene**. Lyon; World Health Organization. *J. Ethnopharmacol.*, v. 82, p. 171–175, 2004.

IATTICI, Fabrizio; CATALLO, Martina; SOLIERI, Lisa. Designing new yeasts for craft brewing: when natural biodiversity meets biotechnology. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 3, 2020.

İSILDAR, P.; YILDIZ, O. Izmir craft beer trail. **Univers. J. Manag.**, v. 8, n. 5, p. 209-219, 2020.

JANIK, E.; NIEMCEWICZ, M.; CEREMUGA, M.; STELA, M.; SALUK-BIJAŁ, J.; SIADKOWSKI, A.; BIJAŁ, M. Molecular aspects of mycotoxins—A serious problem for human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8187, 2020.

JANTYIK, L.; BALOGH, J. M.; TÖRÖK, Á. What Are the Reasons Behind the Economic Performance of the Hungarian Beer Industry? The Case of the Hungarian Microbreweries. **Sustainability**, v. 13, p. 2829, 2021.

JECFA. **Evaluation of certain contaminants in food**. Eighty-third report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Food and Agriculture

Organization of the United Nations, World Health Organization, WHO Technical Report Series 1002, World Health Organization, Geneva, 2017.

JÍLEK, Jan; GOLEC, M.; BEDNÁŘ, P.; CHYTRÁČEK, M.; VÍCH, D.; ZAVORAL, T. *et al.* The oldest millet herbal beer in the Europe? The ninth century BCE bronze luxury bucket from Kladina, Czech Republic. **Archaeometry**, 2021.

JIN, Z.; GILLESPIE, J.; BARR, J.; WIERSMA, J. J.; SORRELLS, M. E.; ZWINGER, S.; *et al.* Malting of Fusarium head blight-infected rye (*Secale cereale*): Growth of Fusarium graminearum, trichothecene production, and the impact on malt quality. **Toxins**, v. 10, n. 9, p. 369, 2018.

JOUBRANE, K.; MNAYER, D.; EL KHOURY, A.; EL KHOURY, A.; AWAD, E. Co-occurrence of aflatoxin B1 and ochratoxin A in Lebanese stored wheat. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 9, p. 1547-1552, 2020.

KEUKELEIRE, Denis. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 108-112, 2000.

KLIMCZAK, Krystian; CIOCH-SKONECZNY, Monika. Mycotoxins in beer®. **Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego**, 2020.

KORPELAINEN, H.; PIETILÄINEN, M. Hop (*Humulus lupulus* L.): Traditional and Present Use, and Future Potential. **Economic Botany**, p. 1-21, 2021.

KUMAR, Ashly. **Impact of Yeast Strain and Fermentation on Perceived Hop Flavour in Beer**. Tese de Doutorado. University of Otago, 2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10523/9968>. Acesso em: 23 dez. 2021.

LAFONTAINE, Scott R.; SHELLHAMMER, Thomas H. Impact of static dry-hopping rate on the sensory and analytical profiles of beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 4, p. 434-442, 2018.

LAGO, Laura Oliveira *et al.* QuEChERS-LC-QTOFMS for the simultaneous determination of legislated and emerging mycotoxins in malted barley and beer using matrix-matched calibration as a solution to the commercial unavailability of internal standards for some mycotoxins. **Food Chemistry**, v. 345, p. 128744, 2021.

LEDLEY, Andrew J.; ELIAS, R. J.; HOPFER, H.; COCKBURN, D. W. A Modified Brewing Procedure Informed by the Enzymatic Profiles of Gluten-Free Malts Significantly Improves Fermentable Sugar Generation in Gluten-Free Brewing. **Beverages**, v. 7, n. 3, p. 53, 2021.

LEWIS, Michael J.; YOUNG, Tom W. Hop chemistry and wort boiling. In: **Brewing**. Springer, Boston, MA, 2001. p. 259-278.

LIU, L.; WANG, J.; LEVIN, M. J.; SINNOTT-ARMSTRONG, N.; ZHAOD, H.; ZHAOE Y.; SHAO, J.; DIF, N.; ZHANG, T. The origins of specialized pottery and diverse alcohol fermentation techniques in Early Neolithic China. **PNAS**, v. 116, n. 26, p. 12767–12774, 2019.

LOGRIECO, A.; FERRACANE, R.; HAIDUKOWSKY, M.; COZZI, G.; VISCONTI, A.; RITIENI, A. Fumonisin B2 production by *Aspergillus niger* from grapes and natural occurrence in must. **Food Additives and Contaminants**, v. 26, n. 11, p. 1495-1500, 2009.

MAICAS, Sergi. The role of yeasts in fermentation processes. **Microorganisms**, v. 8, n. 8, p. 1142, 2020.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário da Cerveja 2020. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/anuario-da-cerveja-2019/view>. Acesso em: 03 jan. 2022.

MARCHESE, S.; POLO, A.; ARIANO, A.; VELOTTO, S.; COSTANTINI, S.; SEVERINO, L. Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 6, 2018.

MARTINS, P. A. **Análises físico-químicas utilizadas nas empresas de Vinificação necessárias ao acompanhamento do processo de elaboração de vinhos brancos**. Rio Grande do Sul, Título de graduação, CEFET-BG, 2007. 48 p.

MARUME, P.; NDLOVU N, Manhokwe S.; NDLOVU, C. Detection of mycotoxins in opaque beer production. 2020.

MASCIA, I.; FADDA, C.; DOSTÁLEK, P.; OLŠOVSKÁ, J.; DEL CARO, A. Preliminary characterization of an Italian craft durum wheat beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 495-499, 2014.

MASSAROLO, K. C.; JORGE, C. F. F.; KUPSKI, L.; BADIALE-FURLONG, Eliana. Optimization of Matrix Solid-Phase Dispersion Method for Extraction of Aflatoxins from Cornmeal. **Food Analytical Methods**, v. 11, p. 1-10, 2018.

MASTANJEVIĆ, Kristina; ŠARKANJ, B.; KRŠKA, R.; SULYOK, M.; WARTH, B.; MASTANJEVIĆ, K.; *et al.* From malt to wheat beer: A comprehensive multi-toxin screening, transfer assessment and its influence on basic fermentation parameters. **Food chemistry**, v. 254, p. 115-121, 2018.

MATEJOVA, I.; SVOBODOVA, Z.; VAKULA, J.; MARES, J.; MODRA, H. Impact of mycotoxins on aquaculture fish species: A review. **Journal of the world aquaculture society**, v. 48, n. 2, p. 186-200, 2017.

MATRAXIA, Michele; ALFONZO, A.; PRESTIANNI, R.; FRANCESCA, N.; GAGLIO, R.; TODARO, A.; *et al.* Non-conventional yeasts from fermented honey by-products: Focus on *Hanseniaspora uvarum* strains for craft beer production. **Food Microbiology**, v. 99, p. 103806, 2021.

MATSUBARA, KAORI A; PLATH, R A. **Desenvolvimento de Cerveja Artesanal de Trigo adicionada de Gengibre** (*Zingiber officinale* Roscoe). 2014. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2014.

MEBAK (MITTELEUROPÄISCHE BRAUTECHNISCHE ANALYSENKOMMISSION). **Raw materials - barley, adjuncts, malt, hops and hop products - collection of brewing analysis methods of the Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission (MEBAK)**. 2. ed. Nuremberg: Fachverlag Hans Carl 2017.

MEDINA, Á.; VALLE-ALGARRA, F. M.; MATEO, R.; GIMENO-ADELANTADO, J. V.; MATEO, F.; JIMÉNEZ, M. Survey of the mycobiota of Spanish malting barley and evaluation of the mycotoxin producing potential of species of *Alternaria*, *Aspergillus* and *Fusarium*. **International journal of food microbiology**, v. 108, n. 2, p. 196-203, 2006.

MELLOR, Duane D.; HANNA-KHALIL, Bishoy; CARSON, Raymond. A review of the potential health benefits of low alcohol and alcohol-free beer: Effects of ingredients and craft brewing processes on potentially bioactive metabolites. **Beverages**, v. 6, n. 2, p. 25, 2020.

MOLINA-GARCÍA, Lucía; CÓRDOVA, Maria Luisa Fernández-de; RUIZ-MEDINA, Antonio. Indirect determination of aflatoxin B1 in beer via a multi-commuted optical sensor. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 29, n. 3, p. 392-402, 2012.

MOSHER, Michael; TRANTHAM, Kenneth. Milling and Mashing. In: **Brewing Science: A Multidisciplinary Approach**. Springer, Cham, 2021. p. 167-197.

OLAJIRE, Abass A. The brewing industry and environmental challenges. **Journal of Cleaner Production**, v. 256, p. 102817, 2020.

PAGKALI, Varvara *et al.* Simultaneous determination of aflatoxin B1, fumonisin B1 and deoxynivalenol in beer samples with a label-free monolithically integrated optoelectronic biosensor. **Journal of hazardous materials**, v. 359, p. 445-453, 2018.

PAIX, Murilo Dabruzzo. **Uma avaliação qualitativa da presença de micotoxinas e micro-organismos toxigênicos em insumos e em cervejas artesanais**. Tese de Doutorado. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2019. 132f. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/13290/Disserta%c3%a7%c3%a3o%20Murilo%20D%20Abruzzo%20Paix%20%20Final.docx.pdf?sequence=5&isAllowed=y>. Acesso em: 03 jan. 2022.

PAPAZIAN Charlie, GATZA Paul, SWERSEY Chris, SKYPECK Chuck, e RABIN Dan. **Beer Style Guidelines**. Brewers Association (BA). Edição de 2018. 47p.

PAPAZIAN, Charlie. Beer Styles: Their Origins and classification. In: Stewart, G. G., Russell, I.; Anstruther, A. (Eds.). **Handbook of brewing**. CRC Press: 2017.

PASCARI, X.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S.; SANCHÍS, V. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. **Food Research International**, v. 103, p. 121-129, 2018.

PAULETTE, Tate. Inebriation and the early state: Beer and the politics of affect in Mesopotamia. **Journal of Anthropological Archaeology**, v. 63, p. 101330, 2021.

PEREIRA V. L.; FERNANDES, J. O.; CUNHA, S. C. Mycotoxins in cereals and related foodstuffs: a review on occurrence and recent methods of analysis. **Trends in food Science & Technology**, 36, 96-136, 2014.

PHAN, Lien Thi Kim; TRAN, T. M.; DE BOEVRE, M.; JACXSENS, L.; EECKHOUT, M.; DE SAEGER, S. Impact of Season, Region, and Traditional Agricultural Practices on Aflatoxins and Fumonisin Contamination in the Rice Chain in the Mekong Delta, Vietnam. **Toxins**, v. 13, n. 9, p. 667, 2021.

RATERS, M.; MATISSEK, R. Thermal stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A. **Mycotoxin research**, v. 24, n. 3, p. 130-134, 2008.

RIVAROLI, S.; CALVO-PORRAL, C.; SPADONI, R. Using food choice questionnaire to explain Millennials' attitudes towards craft beer. **Food Quality and Preference**, v. 96, p. 104408, 2022.

ROCHA, Andrea Rebouças; *et al.* Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in beers produced in Brazil and their carcinogenic risk evaluation. *Food Control*, 2022, 109348. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109348>.

ROSALES, Alicia; TALAVERANO, M.I.; LOZANO, J.; SÁNCHEZ-VICENTE, C.; SANTAMARÍA, Ó.; GARCÍA-LATORRE, C.; RODRIGO, S. Craft beer vs industrial beer: chemical and sensory differences. **British Food Journal**, v 123, n. 12, p. 4332-4346, 2021.

SALANȚĂ, Liana Claudia; COLDEA, T. E.; IGNAT, M. V.; POP, C. R.; TOFANĂ, M.; MUDURA, E.; *et al.* Non-alcoholic and craft beer production and challenges. **Processes**, v. 8, n. 11, p. 1382, 2020.

SCHABO, D. C., MARTINS, L. M., IAMANAKA, B. T., MACIEL, J. F., TANIWAKI, M. H., SCHAFFNER, D. W.; MAGNANI, M. Modeling aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* during wheat malting for craft beer as a function of grains steeping degree, temperature and time of germination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, 108777, 2020a.

SCHABO, D. C., MARTINS, L. M., MACIEL, J. F., IAMANAKA, B. T., TANIWAKI, M. H., SCHAFFNER, D. W.; MAGNANI, M. Production of aflatoxin B1 and B2 by *Aspergillus flavus* in inoculated wheat using typical craft beer malting conditions. **Food Microbiology**, v. 89, 103456, 2020b.

SCHABO, D. C.; FREIRE, L.; SANT'ANA, A. S.; SCHAFFNER, D. W.; MAGNANI, M. Mycotoxins in artisanal beers: An overview of relevant aspects of the raw material, manufacturing steps and regulatory issues involved. **Food Research International**, v. 141, p. 110-114, 2021.

SCHUINA, G. L.; QUELHAS, J. O. F., DE CARVALHO, G. B. M.; DEL BIANCHI, V. L. Use of carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae) as a total substitute for hops in the production of lager beer. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 44, n. 10, p. e14730, 2020.

SOUTO, Pollyana; AUGUSTO, Laurinda; GREGORIO, Mayra; OLIVEIRA, Carlos. Principais micotoxícoses em suínos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 2, 2017.

SPEDDING, G. Craft beer & brewing magazine: acidity. **Beer and Brewing**, 2017. Disponível em: <https://beerandbrewing.com/dictionary/Bc3C4qEYz3/>. Acesso em: 02 jan. 2022.

SRIWATTANAPONG, Kanokwan; SLOCUM, S. L.; CHAWANTHAYATHAM, S.; FEDELES, B. I.; EGNER, P. A.; GROOPMAN, J. D. Editor's highlight: pregnancy alters aflatoxin B1 metabolism and increases DNA damage in mouse liver. **Toxicological Sciences**, v. 160, n. 1, p. 173-179, 2017.

STEWART, G. G.; RUSSELL, I.; ANSTRUTHER, A. (Ed.). **Handbook of brewing**. CRC Press, 2017.

THESELING, Florian A.; BIRCHAM, P. W.; MERTENS, S.; VOORDECKERS, K.; VERSTREPEN, K. J. A hands-on guide to brewing and analyzing beer in the laboratory. **Current protocols in microbiology**, v. 54, n. 1, p. e91, 2019.

TÓFOLI, RODOLFO JOSÉ. **Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de cervejas comerciais e artesanais**. Instituto Municipal de Ensino Superior do Município de

Assis–Imesa e Fundação Educacional do Município de Assis–Fema, Assis, 2014. Disponível em: <https://cepein.femanet.com.br/BDigital/arqTccs/1211360511.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2022.

VASAS, Morgan; TANG, Fenfen; HATZAKIS, Emmanuel. Application of NMR and Chemometrics for the Profiling and Classification of Ale and Lager American Craft Beer. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 807, 2021.

VIANA, A. C.; PIMENTEL, T. C.; DO VALE, R. B.; CLEMENTINO, L. S.; FERREIRA, E. T. J.; MAGNANI, M.; LIMA, M. S. American pale Ale craft beer: Influence of brewer's yeast strains on the chemical composition and antioxidant capacity. **LWT**, v. 152, p. 112317, 2021.

VICAM, P. L. **Aflatest®**: Instruction Manual. Watertown; 1999. p. 80-81.

VILLACRECES, Salvador; BLANCO, Carlos A.; CABALLERO, Isabel. Developments and characteristics of craft beer production processes. **Food Bioscience**, p. 101495, 2021.

WILSON, J. Walter; PLUNKETT, Orda A. 29. Identification of fungi of importance in medical mycology. In: **The Fungous Diseases of Man**. University of California Press, 2020. p. 314-391.

WOODCOCK, A. A.; STEEL, N.; MOORE, C. B.; HOWARD, S. J.; CUSTOVIC, A.; DENNING, D. W. Fungal contamination of bedding. **Allergy**, v. 61, n. 1, p. 140-142, 2006.

ZAHRA, AL-Timimi. A comparative study of determination the spectral characteristics of serum total protein among laser system and spectrophotometric: advantage and limitation of suggested methods. **Current Analytical Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 583-590, 2019.

ZHAO, Ling; ZHANG, L.; XU, Z.; LIU, X.; CHEN, L.; DAI, J.; *et al.* Occurrence of Aflatoxin B1, deoxynivalenol and zearalenone in feeds in China during 2018–2020. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2021.

ZYCHOWSKI, K. E.; HOFFMANN, A. R.; LY, H. J.; POHLENZ, C.; BUENTELLO, A.; ROMOSER, A. The effect of aflatoxin-B1 on red drum (*Sciaenops ocellatus*) and assessment of dietary supplementation of NovaSil for the prevention of aflatoxicosis. **Toxins**, v. 5, n. 9, p. 1555-1573, 2013.

APÊNDICE A – ARTIGO:**PERIÓDICO:****ISSN:****QUALIS:****FATOR DE IMPACTO**

WHEAT CRAFT BEER MADE FROM AFB₁ CONTAMINATED WHEAT MALT CONTAINS DETECTABLE MYCOTOXINS, RETAINS BASIC QUALITY PARAMETERS AND DIFFERS IN ETHANOL, SUGAR AND PHENOLIC CONTENT

ABSTRACT

This article addresses the quantification of AFB₁ levels in the different stages of the production of wheat craft beer, as well as in the final product made with contaminated wheat malt. Physicochemical parameters such as density, pH, color, acidity, yeast counting, determination of sugars, organic acids, alcohols and phenolic were evaluated. Finally, the quality parameters of the final product were verified. Regarding the determination of AFB₁, our findings demonstrate that AFB₁ levels fluctuated during the brewing of wheat craft beer, and that they are present in the final beer sample at concentrations that are five times higher than those that are recognized by the Brazilian legislation on cereals or their derivatives, the US Food and Drug Administration for food, and the European Union for cereal products. Given that the water density is comparable to that of the final beer sample and that the US legal limit for AFB₁ in processed cereal-based foods is 0.02 g/kg, the values found in the final beer were 0.22 g/kg.

Keywords: Craft wheat beer. Aflatoxins. Beer composition.

1 INTRODUCTION

According to the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, there are more than 1,383 craft breweries registered in the nation, up 14.4% over the previous year. This is a striking growth from the 40 breweries the nation had at the start of the twenty-first century (MAPA, 2021). One of the fastest-growing business sectors in the world is the alcoholic beverage industry, and the rise in popularity of craft beer over the past several years has been one of the main drivers of this expansion (ERHARDT *et al.*, 2022).

Craft beer is additionally chosen based on distinct flavor preferences from commercial beer, is typically consumed in bars and with domestic environmental, and is thought to be of greater quality than commercial beer due to the ingredients used in its brewing and general quality (JAEGER *et al.*, 2021). Beer's high phenol content distinguishes it as a food high in polyphenols that is endorsed for preventing diseases brought on by oxidative stress (OSORIO-PAZ, BRUNAUER, ALAVEZ, 2019).

Different substrates are used in fermentation, including sorghum (EINFALT, 2021), malted wheat (BYEON *et al.*, 2021), different hop types (HOPFER *et al.*, 2021), and several yeast strains (MATRAXIA *et al.*, 2021). The primary ingredient in traditional beer used to make craft beer is barley malt, which can make up more than 90% of the dry weight of the wort. While raw wheat, whether malted or unmalted, makes up 50% of the ingredients in wheat craft beer, barley malt makes up the remaining 50% (FLAVIIS *et al.*, 2022).

Different beer types result from variations in the brewing process and the ingredients used, which may also affect the nutrients present, particularly the chemical composition. Their nutrient differences can be attributed to the way malt is used and treated, the hops and yeast employed, the kind of alcoholic fermentation, and the technical procedures used during brewing (PFERDEMENGES *et al.*, 2022). One measure of the processing and marketing of beverages'

quality is the polyphenol content of beers. The kind and concentration of phenolic compounds affect the stability and shelf-life of beer in addition to flavor, color, froth, turbidity, bitterness, colloidal, and sensory qualities (AMBRA; PASTORE; LUCCHETTI, 2021).

Numerous research have looked into the properties of beers in relation to the phenolics present in the finished product. Six chemicals appear to be responsible for the majority of the antioxidant capacity (55%–88%) in commercial beers, with ferulic acid accounting for over 50% of this and the other ingredients being syringic acid, (+)-catechin, caffeic acid, protocatechuic acid, and (-)-epicatechin (ZHAO *et al.*, 2010; HEUBERGER *et al.*, 2016; SHI *et al.*, 2017). This research was only done on commercial lagers, which don't have the same complexity as many craft beers and ales (MAROVA *et al.*, 2011). Malt and hops are the primary sources of polyphenolic chemicals in beer, which are thought to be one of the main sources of the beverage's antioxidants. By using HPLC-DAD-ESI-MS/MS measurements, Cheiran *et al.* (2019) investigations found 57 phenolic chemicals, 12 of which had never been found in beer before. The final step was realized to confirm the final product's quality parameters.

Contamination of the raw materials and the production process might endanger consumer health. Additionally, unlike industrial beers, craft beers are not pasteurized or filtered during manufacturing, which increases their susceptibility to contamination and microbial deterioration (SCHABO *et al.*, 2021).

According to the findings of Mastanjevic *et al.* (2018) in this investigation on the effects of mycotoxin contamination, such as DON, on fermentation parameters in wheat beer, the presence of mycotoxins in the wort slightly changed the concentrations of the final products (ethanol and glycerol). Additionally, they had a stronger impact on the dynamics of alcoholic fermentation, which led to a slight extension of the primary fermentation when malt tainted with *F. culmorum* was utilized.

Before harvest or during storage, mycotoxins like fumonisins B₁ and B₂ (FB₁), aflatoxins B₁ and B₂ (AFB₁ and AFB₂), and ochratoxin A (OTA), which are produced by filamentous fungi like *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Penicillium*, can contaminate grains used as a raw material to make malt or even as adjuvants in beer (KLIMCZAK; CIOCH-SKONECZNY (PHAN *et al.*, 2021). Aflatoxin B₁ (AFB₁), which is most frequently linked to corn and peanuts, is the most well-known mycotoxin. It typically occurs in wheat owing to storage (ZAHRA, 2019), although it can also happen in the field depending on the weather (JOUBRANE *et al.*, 2020).

Both the presence and absence of fungus do not ensure that the grain is devoid of mycotoxins. The presence of fungi does not mean that the grains are contaminated with them. Since each form's durability varies, heating stages may be necessary to completely destroy the fungus, whereas mycotoxin, for instance, can persist at high temperatures (ALAM; NISA; DAUD, 2022).

In this sense, it can be said that AFB₁ and AFB₂ present in the malted grains will remain in the final product, as the wort heating temperature does not reach values above 100 °C, while these toxins are thermoresistant and are destroyed at temperatures above 120 °C (ARZANDEH; JINAP, 2011; RATERS; MATISSEK, 2008; PASCARI *et al.*, 2018). Schabo *et al.* (2020a) investigated the levels of AFB₁ produced in wheat grain during malting for the production of wheat craft beer, where an increase in AFB₁ level was observed with increasing temperature or germination time.

Based on the above, the aim of the present study was to measure AFB₁ levels in the various stages of the wheat and craft beer brewing process, as well as in the product development with contaminated wheat malt. Yeast numbers and density were assessed during wort fermentation. During the brewing of beer, sugars, organic acids, alcohols, and phenolic chemicals were also identified.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Raw material

The grains of wheat (*Triticum aestivum* L.), approximately 1 kg, were purchased at a supply store for brewers located in the city of João Pessoa, state of Paraíba, Brazil. All samples used were evaluated according to the procedures described in item 2.2 and no mycotoxins were identified. All reagents used are analytical grade and the water used in the preparation of the extraction solution and in the mobile phase was obtained by a Milli-Q purification and filtration system with a resistivity of 18 MW/cm.

2.1.1 Experimental malting of wheat grains for AFB₁ production

For the production of AFB₁ during malting, the aflatoxigenic strain *A. flavus* CCCA 11553, belonging to the Collection of Microorganism Cultures of the Department of Food Science, Federal University of Lavras, CCCA/WDCM1081, originally isolated from wheat grains used in beer production craft was used as a test strain. The strain *A. flavus* CCDCA 11553, maintained on silica gel at 4 °C, was reactivated by inoculating contaminated silica granules on the surface of malt extract agar (MEA) with subsequent incubation at 25 °C for 7 days. Subsequently, the strain was cultivated in MEA at 25 °C for 7 days to allow sporulation. Spores were collected by scraping with a mixture of sterile distilled water and 0.1% Tween 80. The suspension (~10 mL) was filtered through triple gauze and the number of spores was

checked using a Neubauer chamber. The inoculum ($\sim 10^6$ spores/ml) was obtained by mixing 100 ml of the suspension with 900 ml of sterile distilled water.

The malting of wheat grains was carried out following the conditions proposed by in accordance with the standard malting procedure proposed by the Central European Commission of Brewing Analysis (MEBAK) for brewing beer as described by Schabo *et al.* (2020). Artificial contamination was carried out by adding the spore suspension of *A. flavus* CCCDCA 11553 (10^6 spores/mL) to wheat grains previously disinfected by immersion in 1% sodium hypochlorite for 10 minutes and washed twice with sterile distilled water.

Malting comprised the stages of maceration, germination and drying (MEBAK, 2017). For maceration, the disinfected wheat grains were immersed in the inoculum for 5 h, aerated for 19 h, again immersed in sterilized distilled water for 4 h, and finally aerated for an additional 20 h (grain maceration degree of 45%). To maintain moisture, the process involved spraying the wheat grains with sterile distilled water every 12 hours.

Subsequently, germination was carried out for four days in a BOD-type greenhouse (Caltech, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil) with controlled conditions of 14.5 ± 0.5 °C and 95-98% relative humidity. The grains were turned every 12 h to promote aeration and humidity was maintained by spraying sterile distilled water. After this step, the germinated inoculated grains (green malt) were subjected to drying in a ramp starting with 16 h at 50 °C, followed by 1 h at 60 °C, 1 h at 70 °C and finally 5 h at 80 °C. Subsequently, the wheat malt was removed from the oven, left at room temperature and the rootlets were manually removed from the malt.

2.2 Production of wheat craft beer on a laboratory scale

Barley and wheat malt, hops and yeast for the production of wheat craft beer were purchased at stores specializing in the sale of inputs for brewing beer, in the city of João Pessoa,

state of Paraíba, Brazil. The malt samples were confirmed to be AFB₁ free. According to Schabo *et al.* (2020). The beer production steps comprised grinding, mashing, filtration, boiling, fermentation and maturation as described in table 1.

2.2.1 From grinding to cooling

In the milling step, wheat malt contaminated with AFB₁ (WM; 450 g) and mycotoxin-free barley malt (450 g) were ground in a laboratory mill, with an adjusted distance between the crushing cylinders of 1.8 mm, to obtain a desirable particle size and expose the starch contained therein. Then the ground malts were mixed (MM; 900 g) and 3 L of water at 45 °C were added, with constant stirring (PAIX, 2019). The infusion temperature dropped to 43 °C and the wort was kept at this temperature for 15 min. Subsequently, the temperature was raised to 52 °C under intense stirring and the wort remained at rest at this temperature for 20 min. After this time, the temperature was increased to 66 °C under constant stirring and the wort was allowed to stand for 40 min (MATSUBARA, 2014). Finally, the temperature was raised to 78 °C, in which the wort was kept for 5 minutes to deactivate the enzymes (mashout) (MATSUBARA, 2014; PAIX, 2019). The mashing procedure was completed when the iodine test was negative, that is, when all the starch present in the wort was converted into sugars by the enzymes, and the sample was collected (M).

After mashing, the wort was filtered/clarified to separate the liquid phase of the wort from the malt bagasse in order to extract as much sugar as possible from the solid. In this technique, heated water (80 °C) is added to spent beans (SG) while the wort free of solids and sediment is filtered. After the wort was filtered, the wort was boiled and hopped with the aim of sterilizing the wort, isomerizing the bitter substances of the hops, evaporating unwanted volatile substances and concentrating the wort. The filtered sweet wort (SW) was slowly heated

to its boiling point (1 °C/min), with continuous mixing. When the wort temperature reached 100 °C (~10 min), 1 g of Bart Haas Hallertau Magnum (LNF, Germany, 2021) Magnum hops (11-16% alpha acids) was added and the hopped wort was boiled for 50 minutes (PAIX, 2019; TÓFOLI, 2014), totaling 60 min in the boiling step. In this step, there is still a reduction in pH, Maillard reaction with an increase in the color of the wort and formation of the Trub with coagulation of proteins that settle at the bottom of the boiling vessel along with the remains of the hops used.

Then, cooling was performed in order to separate the Trub and adjust the temperature. In the separation of the Trub, the precipitation of the rest of hops and proteins occurs. During cooling, this solid material decants and, through the whirlpool, a technique that works by stirring the wort in circular motions to concentrate this material in the center of the container to later be separated from the wort. Then, the wort was cooled to fermentation temperature (21 °C), ideal for inoculating the yeast. After cooling the hopped wort, the original density (OG, original gravity) was measured, according to 3.4, to verify the amount of sugars, before fermentation, that will influence the alcohol content of the beer. Recipe OG can be corrected at this time, however this correction was not necessary.

2.2.2 Fermentation and maturation

The cooled wort (21 °C) was transferred to a cylindrical conical fermenter closed to prevent the entry of oxygen, but with an outlet for the generated carbon dioxide. The wort was inoculated with *Saccharomyces cerevisiae* (WB-6; 106 CFU/mL) and left to rest for eight days at controlled temperature (21 °C). During fermentation, the relative density (SG; specific gravity) was measured every 24 h to verify the relationship between the density of sugars and the density of water, until the density remained constant. The final density (FG; final gravity)

is the amount of sugars after fermentation and when constant it means that the work of the yeast has ceased and the fermentation has stopped. The measurement of SG and FG were also measured according to 2.5.

After 8 days of fermentation, the yeasts deposited at the bottom of the fermenter were removed (SY) and the liquid, called green beer (GB), was kept at 0 °C for five days for maturation (PAIX, 2019).

2.3 AFB₁ quantification in beer production process samples

Samples free of detectable mycotoxins were used for the development and validation of the aflatoxin B₁ detection method. Analyses of AFB₁ levels were performed in the steps described in Table 2. To identify and quantify AFB₁, samples of approximately 50 mL (liquid samples; SW, GB, SY, B) or 50 g (solid samples; WM, B) were collected. AFB₁ determination was performed by liquid-liquid partition (PLL) extraction methods and vortex-assisted solid phase matrix dispersion (MSPD) technique, respectively.

The PLL extraction process was performed by adding a 2 mL aliquot of sample to a Falcon tube (15 mL) and then adding 1 mL of chloroform (P.A. ACS/ISO 1,000 mL; 99.8%). The mixture was vortexed for 3 minutes and an additional 1 mL of chloroform was added to the mixture. It returned to stirring for 3 minutes, followed by the addition of 1 mL of potassium chloride solution (KCl - 2% m/v). The new mixture was stirred for 1 min and kept at -10 °C for 10 min.

After this procedure, centrifuged at 5800 x g for 10 min at 4 °C was performed. The volume of 1 ml of the organic phase separated in the centrifuge was transferred to an amber flask and the solvent was evaporated by heating in a sand bath (50 °C) until complete evaporation.

The resuspension of solid residue was carried out in 1 ml of 9:1 (v/v) acetonitrile:water mobile phase. The samples that showed turbidity were filtered through a nylon filter (0.45 nm). The solution containing the sample and the mobile phase wT). Determinations were performed in triplicate.

The extraction of solid samples by means of VA-MSPD was extraction by means of MSPD (MASSAROLO *et al*, 2020) was performed using 1 g of the homogenized sample and 0.5 g of solid support (C₁₈) transferred to the mortar. The mixture was macerated with a pestle for 5 min to achieve an apparently uniform granulometry. The solid mixture was transferred to the Falcon tube and 10 ml of the 1:1 (v/v) methanol:acetonitrile mixture was added. The mixture was vortexed for 3 minutes and centrifuged at 5800 x g for 10 min at 4 °C.

The 5 mL volume of the supernatant was transferred to an amber flask and the extracting solvent was completely evaporated in a sand bath (50 °C). The pellet was resuspended in 1 mL of 9:1 (v/v) acetonitrile:water mobile phase and samples showing turbidity were filtered using a nylon filter (0.45 nm). The extract was injected into HPLC-FL. Samples were quantified for column retention time using the standard curve in matrix extract.

The methods were validated by determining the limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), accuracy (recovery), precision (repeatability and intermediate precision) and matrix effect, according to EC guidelines (2006) and ANVISA (2003). LOD was determined by the signal-to-noise ratio at the retention time of the standard. LOQ was defined as the lowest concentration of analyte whose signal was reliably detected. Recovery was determined at three concentration levels (x, y and z ng/mL) with efficiency demonstrated by values between 70 and 120% with relative standard deviation (RSD) $\leq$ 20%. For calculation of aflatoxin concentrations in analytical samples

2.4 Determination of sugars and alcohols during the production of craft wheat beer

The simultaneous determination of the parameters of sugars and alcohols (Table 3) were carried out in samples M, SW, GB, and B, using HPLC with refractive detection (RID) following the methodology of Ball and Lloyd (2011), with modifications. The samples were previously diluted in ultrapure water, filtered through a 0.45 μm nylon membrane and injected (10 μL). The solvent flow was 0.8 mL/min. An Agilent Hi-Plex H ion exchange column (7.7 x 300 mm, 8 μm) protected by a PL Hi-Plex H (5 x 3 mm) pre-column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) was used). The run time lasted 20 minutes ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$) and the mobile phase was 0.004 mol/L H_2SO_4 .

All data were processed using OpenLAB CDS ChemStation Edition software (Agilent Technologies, Santa Clara - USA) and identification and quantification were performed by comparison with external standards.

2.5 Determination of organic and phenolic acids during the production of wheat craft beer

Organic and phenolic acids (Table 4 and 5) were identified in samples M, SW, GB, and B, and the determination was performed using an Agilent 1260 Infinity LC System liquid chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara - USA) coupled to an array detector. diode (DAD) (model G1315D), and a RID (refractive index detector) (model G1362A).

To determine the individual phenolic compounds, RP-HPLC/DAD chromatograph was used according to the methodology of Padilha *et al.* (2018) and adapted by Dutra *et al.* (2018). Where, 20 μL of beer were previously filtered and injected through a membrane (Millex-HA, Millipore, Badford, MA). The column used was Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100 x 4.6 mm, 3.5 μm) and the pre-column Zorbax C18 (12.6 x 4.6 mm, 5 μm) (Zorbax, USA).

All data were processed using OpenLAB CDS ChemStation Edition software (Agilent Technologies, Santa Clara - USA) and identification and quantification were performed by comparison with external standards.

2.6 Determination of quality parameters in the final product

The craft beer produced was evaluated in terms of pH (Quimis model Q400as) and color parameters (Konica Minolta colorimeter, model CR 400). Total solids were also determined according to the AOAC methodology (2012). The results can be found in the table 6.

2.6.1 Density determination during wort fermentation

Samples for density determination (Table 7) were collected in the cooled hopped wort to know the OG and every 24 h of fermentation (SG) until the density remained constant (FG). The samples were evaluated for density using a densimeter (Incoterm®) for specific mass with graduation from 1000 to 1060, in g/mL, calibrated at 20 °C. To perform the relative density analysis, an aliquot of 25 mL was taken from the first stage of the wort to the final beer sample after fermentation. The liquid sample was placed in a 250 mL beaker, the temperature was measured and then the density meter was added, which remained free in the sample, in which the liquid surface determined the scale and, consequently, the density (MARTINS, 2007).

2.6.2 Yeast cell count during wort fermentation

The yeast cells count was performed using a Neubauer chamber. Samples were collected from the hydrated yeast, before inoculation into the wort (Y), after 24 h of inoculation (W1)

and every 48 h until the seventh day of fermentation (W2-W4). As on the eighth day of fermentation, the density was constant, confirming that the fermentation had ceased, the yeast count was performed in the decanted yeast liquid that was discarded (SY). A total of six counts were performed, as shown in Table 8.

The collected samples were submitted to serial dilution. Aliquots of 10 μ L of each dilution were transferred to each compartment of the Neubauer chamber and taken to the electron microscope (400x magnification), where the total cell count was performed in the four quadrants of the extremities and in the central quadrant.

2.7 Statistical analysis

Samples were analysed in duplicate. Results related to AFB₁ levels were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Differences in AFB₁ levels were analysed by statistical analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test in the R statistical environment version 3.6 (R Core Team, 2019). The confidence level for significance was set at $p < 0.05$.

3 RESULTS

All samples were subjected to determination of AFB₁ concentration, and the result was given in μ g/kg for solid samples and μ g/L for solution samples. Method reliability data were LOQ, linearity, recovery and precision. Average recovery of 3 levels: 85% and 83% respectively for AFB₂ and AFB₁; Repeatability: CV=8%; MSPD Quantification Limit: 0.02 ng/g and 0.05ng/mL, respectively for AFB₂ and AFB₁ and PLL Quantification Limit: 0.01ng/mL and 0.03ng/mL respectively for AFB₂ and AFB₁.

Aflatoxin B₁ levels were determined and are shown in Table 2. According to the results, AFB₁ detected in all samples collected during manufacture of craft wheat beer made with contaminated wheat malt. The concentrations ranging from 1,23–0,71µg/kg for solid samples and 0,34–0,11µg/L for liquid samples. The production of AFB₁ in the wheat malt (WM) and malt grist (MG) were 1.23 µg/kg and 1.01 µg/kg, respectively.

Maltose (Table 3) concentration decreased considerably in samples M (94.72 ± 1.00 mg/L) and B (1.93 ± 0.09 mg/L). Likewise, glucose and fructose also showed very low concentrations in the final samples GB (0.47 ± 0.03 and 0.40 ± 0.15 mg/L, respectively) and B (29 ± 0.03 and 0.36 ± 0.08 mg/L, respectively), when compared to samples collected at the beginning of the process such as M (14.76 ± 0.02 and 2.56 ± 0.09 mg/L, respectively).

In addition, no minimum concentrations were found for the detection of rhamnose (Table 3) in samples SB and B as well as no concentrations of ethanol were detected in sample M. On the other hand, high concentrations of ethanol were found in samples SB and B (41.37 ± 0.04 mg/L and 42.51 ± 0.02 mg/L). Glycerol concentration increased by 2.64 mg/L between samples M and B.

The results found for the number of total phenolic compounds are shown in Table 4. These data were determined for samples M, SW, GB and B. Procyanidin A2 significantly increased its concentration when compared to samples, but accounted for the majority of phenolic compounds in this research, in the samples GB (53.69 ± 0.02 mg/) and B (56.05 ± 0.03 mg/L), followed by catechin (B = 15.04 ± 0.02 mg/L), caftaric acid (B = 1.88 ± 0.02 mg/L), and syringic acid (B = 1.46 ± 0.02 mg/L).

Cis-Resvaterol, Naringenin acids were also found in lower quantities in the SW, GB and B samples (0.00 ± 0.00). Caffeic acid found at concentrations above the LOD (0.00 ± 0.00) only in the M and B samples (0.05 ± 0.02 mg/L; 0.06 ± 0.02 mg/L, respectively).

In contrast, chlorogenic acid found in much higher concentrations in the M sample (4.06 ± 0.03 mg/L), when compared to the B sample (0.67 ± 0.02 mg/L). Kaempferol 3-glucoside concentrations remained in the range between 0.04 and 0.05 mg/L.

Acetic acid (Table 5) significantly increased its concentration when compared to SW (0.32 ± 0.03 mg/L) and B (1.04 ± 0.04 mg/L) samples. In comparison, propionic acid decreased seventeen times when comparing samples M (5.41 ± 0.07 mg/L) and B (0.32 ± 0.03 mg/L). Malic, formic and lactic acids decreased their concentration when compared to samples M and B. Citric acid maintained its concentration practically unchanged in all samples, with the lowest concentration found in the SW sample (0.22 ± 0.01).

Then, the results for the analysis of pH, TDE (Total Dry Extract), color and acidity of the samples are highlighted in table 6. The pH values in the contaminated samples were the same as in the uncontaminated samples, varying in a range of 0.03 - 0.20 only. Acidity had a decrease of 0.16 when comparing samples M and B. The color L^* ranged from 4.8 in samples M and B as well as a^* and b^* ranged from 0.3 and 0.19 between the same samples mentioned. The TDE varied considerably between samples M and B, with a decrease of 10.97. The measured density did not vary between the contaminated and uncontaminated samples and the variation in the final sample (at 168h) was minimal (0.04) (Table 9).

4 DISCUSSION

4.1 Evolution of levels of aflatoxin B₁ in craft wheat beer

Concentration of AFB₁ detected in the SG was around 0.71 µg/kg, lower than in the mashed malt. There are reports of to reduce in concentration because of adsorption of the spent grain. In addition, Aflatoxins B₁ (AFB₁) and B₂ (AFB₂), dropped into less than 20% in the

mashing process when were inoculated on the raw material, according to Villacreces, Blanco and Caballero (2022). AFB₁ present in the raw material is sensitive to some stages of the production process (mash malting, wort boiling and final fermentation) of the brewing process (RUIZ-MEDINA; CORDOVA, 2015).

Our results show that AFB₁ levels varied during the production process of wheat craft beer where they are present in the final beer sample at concentrations five times higher than those accepted by the European Union on cereal products, the US Food and Drug Administration on food and Brazilian legislation on cereals or their derivatives. The US legal limit for AFB₁ in processed cereal-based foods is 0.02 µg/kg, while the values found in the final beer were 0.22 µg/kg, considering that the water density is similar to that found in the final beer sample.

During the production of the wort, with infusion by temperature ramps, the temperature can reach 75 °C, where the water is heated up to 30 °C to carry out the pH correction, and then up to 65 °C to start the process of converting starch into sugar. When starting beta-amylase, the temperature rises to 75 °C in order to terminate the process in alpha-amylase. Therefore, the decrease in AFB₁ levels can be attributed to enzymatic degradation or reaction with the components of wheat starch degradation (SÖYLEMEZ; YAMAÇ; YILDIZ, 2020; TORABI, SATARI; HASSAN-BEYGI, 2020).

Aflatoxin degradation is known to occur at ordinary cooking (~100 °C), even in smaller amounts than temperatures above 160 °C. The aflatoxin content can be reduced by extrusion, but varies according to the use of additives, moisture level and temperature or pressure applied, and can reach an efficiency of up to 80% (KARLOVSKY *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2020).

The levels of AFB₁ found in final samples (GB and B) were 0.34 and 0.22 µg/L, which were significantly different ($p < 0.05$). Perhaps because during beer maturation there was degradation or adsorption of mycotoxins in residual debris and subsequent decanting, justifying

the reduction in this stage. The lowest values found not corroborate data referring to the highest levels described for samples of light lager beer from Mexico, where the highest levels of AFB₁ were recorded in the samples of the months of September, October and November with an average AFB₁ concentration of 0.092, 0.143 and 0.112 µg/L, respectively (ALVARÉZ-SEGOVA *et al.*, 2020). Furthermore, Nigussie *et al.* (2018) observed levels of total aflatoxin, reaching from 1.23 to 12.47 µg/L, in 91.6% of domestic beers collected from the Ethiopian Market.

Fermentation takes place by lowering the temperature as quickly as possible, at room temperature of 25 °C. Thus, the process of pasteurization of the wort carried out, allowing the process of producing alcohol and extracting flavors to begin. An adsorption of mycotoxins on beer fermentation residues (SY) was observed, with a reduction in AFB₁ levels from 0.34 to 0.11 µg/L (67%). Campagnollo *et al.*, (2015) it observed considerable adsorption rates in the case of ZEN (75.1%), but also for AFB₁ (48.1%) and OTA (59.4%). Adsorption occurs by the binding of toxins to β-glucans present in the yeast cell wall, forming hydrogen and Van der Waals bonds. This binding also depends on the proportion of β-1,3-d-glucans and β-1,6-d-glucans in the product (PASCARI *et al.*, 2018; GONÇALVES *et al.*, 2019).

Throughout the manufacture process, AFB₁ decreased ($p < 0.05$) by 87%, compared to the beginning of steeping (M). The levels of AFB₁ detected in the wheat malt, obtained at the end of manufacture process, were of 1,01 µg/kg and 0,22 µg/L ($p < 0.05$), respectively.

Non-uniform amounts of AFB₂ were detected during the chromatographic analysis, which can be derived from analytical errors, sampling errors or, more complexly, due to secondary metabolism that occurred with the production of aflatoxin during the variation of AFB₁ concentration. in the middle. The exploration of AFB₂ was withdrawn due to the focus of the work, but it is an analysis that may be carried out in future works, to determine its role in the concentration and competitiveness with AFB₁.

4.2 Evolution of sugars and alcohols during the alcoholic fermentation of beer

The wort (M) initially showed the highest concentration of maltose ($94.72 \text{ mg/L} \pm 1.00$), followed by glucose ($14.76 \text{ mg/L} \pm 0.02$) and fructose ($2.56 \text{ mg/L} \pm 0.09$), according to Figure 1. Fructose is present in malted barley, while maltose and glucose are released from starch (amylolysis) during the mashing step (DACK *et al.*, 2017). Martinez *et al.* (2017), identified levels of maltose ($38.41 \text{ g/L} \pm 2.75$), glucose ($28.08 \text{ g/L} \pm 1.72$) and fructose ($6.33 \text{ g/L} \pm 0.94$) in the sweet wort, but no glucose levels were identified and fructose in beer. The main sugars found in the wort were maltose (49.5 g/L), glucose (7.7 g/L) and fructose (3.0 g/L), according to Ciosek *et al.* (2020). In the study by Paula *et al.* (2021), the concentrations of maltose (46.29 g/L) and glucose (10.41 g/L) in the wort of uncontaminated wheat craft beer, using the yeast WB-06, while the amounts of glycerol and acetic acid were 2.51 g/L and 0.03 g/L in the final beer, respectively.

The samples included ethanol and glycerol in equal amounts. The resultant sample (42.51 ± 0.02) contained sufficient levels of ethanol when compared to published data for American Pale Ale craft beer, which ranged from 31.05 ± 1.08 to 43.84 ± 0.19 with various *S. cerevisiae* strains (VIANA *et al.* 2021). Therefore, Pferdmenges *et al.* (2022) analyzed 25 samples of retail beer from five different styles of German beer (Pilsner beer, wheat beer, crystal wheat beer, export beer, dark beer) for their composition (ash, protein, ethanol, glucose), vitamins (thiamine, riboflavin, vitamin B6) and elements (copper, manganese) and identified concentrations of ethanol, fructose, glucose and maltose for the wheat beer samples of 42 g/L , 110 mg/L , 210 mg/L and 270 mg/L , respectively.

In the study by Mastenjevic *et al.* (2018), at the end of secondary fermentation, craft wheat beer contaminated with *S. uvarum* contained 30.8 g/L of ethanol and 1.60 g/L of glycerol,

while beer contaminated with *F. culmorum* had 1.20 g/L of glycerol and 26.1 g/L ethanol, that is, it can be said that the concentrations of the final products were minimally influenced by the levels of mycotoxins in the must (ethanol and glycerol). Given that the primary fermentation lasted a little longer in samples contaminated with *F. culmorum*, they also influenced a little more the dynamics of the alcoholic fermentation process itself.

Maltose, glucose, and fructose were all consumed while the fermentation process was going on. Yeasts consume the sugars in wort to produce byproducts including ethanol, carbon dioxide, succinic and acetic acids, glycerol, ester, and aldehydes among others (VIANA *et al.*, 2021). Additionally, glucose was mostly utilized in the early stages of fermentation, with maltose consumption rising as glucose levels dropped. Monosaccharides are the first type of carbohydrates that yeasts prefer, followed by disaccharides and oligosaccharides. The rate of glucose consumption in the wort increases in this way. The catabolite repression of the maltose transporter genes is released after the depletion of glucose, enhancing the use of maltose. Additionally, fructose transfer is less advantageous than glucose (CHAN *et al.*, 2019). Therefore, the presence of aflatoxin B1 affected the consumption of sugars during fermentation.

4.3 Individual phenolic compounds in samples of craft wheat beer

Nineteen phenolic compounds belonging to the families of phenolic acids, flavonoids and stilbenes were determined in samples of Wort (M), Sweet Wort (SW), green beer (GB) and beer (B) (Table 3). Procyanidin A2 was the main quantified compound, followed by Catechin, caftaric acid, chlorogenic acid and syringic acid. The other compounds were observed at values below 1.0 mg/L. As a result of interactions with and precipitation of the salivary proteins, the degree of procyanidin polymerization is also strongly connected to the sense of astringency in beverages (LIU *et al.*, 2021). Due to the significant amounts of catechin and epicatechin

monomers found in barley and hops, the phenolic chemicals found in beer have mostly been linked to these two constituents. Bound phenolics are reportedly released during malting, increasing the amount of free phenolics. The wort's phenolic content rises throughout the mashing and hopping phases, and major phenolic losses occur during the boiling and cold brewing phases (CARVALHO; GUIDO, 2022).

Some phenolic compounds may be more soluble in the presence of higher ethanol concentrations when they are present. Additionally, some yeasts can transform intricate or glycosylated phenolic molecules into a straightforward aglycone (PETRÓN *et al.*, 2021). The concentration of various phenolic compounds may be related to the compounds' precipitation during maturation, their adsorption to hot Trub or yeast cells during processing, or their removal during the conditioning step. In these situations, monophenolic substances are less affected than catechin and dimeric proanthocyanidins (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018).

Therefore, according to a study by Viana *et al.* (2021), the selection of *Saccharomyces* strains during the manufacturing process affects the concentration of phenolic compounds as well as the amounts of sugar and ethanol. The WB-06 yeast that was employed is distinguished by having an exceptionally high attenuation. Wheat beer is fermented using specialized yeast. It creates mildly phenolic (POF+) aromas and esterified flavor that are typical of wheat beers (LENTZ, 2018; BASTGEN; GINZEL; TITZE, 2019).

Viana *et al.* (2021) evaluated individual phenolic compounds in craft beer samples and observed that catechin was the main compound quantified, followed by epicatechin gallate, procyanidin A2, chlorogenic acid, epigallocatechin gallate, quercetin 3-glycoside, and kaempferol 3-glycoside. They also reported the presence of p-coumaric acid and Hesperidin. Several phenolic components, including gallic acid, catechin, epicatechin, quercetin, and especially trans-p-coumaric acid, were found in craft beers, according to Cortese *et al.* (2020).

Craft beers typically have a stronger phenolic profile, according to Yang and Gao (2021), because barley malt is the only type of malt used.

Silva *et al.* (2021) analyzed 15 different Brazilian craft beers and found different concentrations of phenolics, with emphasis on the concentrations of catechin, which reached 124.8 mg/L, epicatechin (51.1 mg/L) and caffeic acid (8.13 mg/L). In addition, the presence of rutin (0.39 to 2.94 mg/L) was verified, which is a flavonoid found in buckwheat, and which is an uncommon flavonoid in industrial beers. Our sample found traces of rutin, but on the scale of 0.09 mg/L in the final beer sample (B), which infers the contaminant's interference in the expected stronger presence of this phenolic compound in the final sample.

In a study with Brazilian industrial beers, six phenolic compounds (rutin and 2,4-dihydroxybenzoic, 4-hydroxybenzoic, caffeic, m-coumaric and salicylic acids) were investigated, but they were not found in the samples, while the craft beer samples developed showed detectable concentrations of rutin and caffeic acid. Furthermore, the content of total phenolic compounds ranged from 4.6 mg/L to 28.3 mg/L, with an average of 13.0 mg/L, while the content in the final sample analyzed in this study (B) ranged from 11.85 to 78.36 (Table 3). (MOURA-NUNES *et al.*, 2016).

According to Ambra, Pastori and Lucchetti (2021) the amount of total phenolics increases three to five times during the mash phase after an initial decrease, phenolics continue to increase during mashing and during hop addition, but decrease markedly during wort boiling, vortexing, fermentation, maturation, stabilization and filtration, losing about 60% of the malt's phenolic content throughout the entire brewing process, in industrial beers. However, according to Table 3, the beer samples showed a phenolic profile about 5.5 times higher than the wort. This may be associated with the production scale, in which less characterized craft beers have higher phenolic contents (BERTUZZI *et al.* 2015).

The initial stage of mashing (hot hydration) involves both enzymatic and non-enzymatic solubilization of phenols, and both are regulated by temperature, time, and the separation of wort, which is when phenol-rich spelt material is extracted (WANNENMACHER; GASTL; BECKER, 2018). Anderson *et al.* (2021) found higher concentrations of the phenolic catechin (132 mg/L), cinnamic acid (36 mg/L), quercetin (32 mg/L) and naringin (11 mg/L) in wheat beer samples, and no concentration of Proanthocyanidins, although these have already been quantified in beer samples. This profile was similar in the studies by Cheiran *et al.* (2019) and Petróñ *et al.* (2021) in wheat beer samples, with a phenolic profile in which catechin and epicatechin concentrations predominated.

In the samples analyzed in this study, it is observed that there was a decrease in the concentrations of chlorogenic acid, while the syringic and caftaric acids showed an increase of about 4.5 and 2.2 times between the wort and beer samples, respectively. A study in soybean samples reports that phenolic components such as vanillin, p-coumaric acid, syringic acid and p-hydroxybenzoic acid, have antifungal activity associated with defense mechanisms against mycotoxycological contamination, in which low concentrations of aflatoxin B₁ were found. (0.96 to 1.67 ng/g) (SILVA; SOUZA; BADIALE-FURLONG, 2019).

According to the aforementioned authors, conjugated phenolic extracts, compared to bound phenolic compounds, inhibited β -amylase activity at lower concentrations. They can have this impact by interacting with enzyme cofactors or by changing the conformation of the enzyme, which can decrease functional activity. The difficulty of an enzyme's action is caused by a portion of the enzyme, which is why enzyme inhibition is not just a function of the concentration of a compound, but also of its specificity. As complex molecules cannot inhibit β -amylase, it is likely that phenolic compounds have an impact on an enzyme cofactor such as calcium (SILVA; SOUZA; BADIALE-FURLONG, 2019).

Changes in pH and organic acids in samples of craft wheat beer

Lactic acid (LA) concentration and pH are the main characteristics used to classify an acidic beer. Sour beers contain LA in the range of 3 to 6 g/L and have a pH of 3.3 to 3.9 (PEYER *et al.*, 2017), but some sour beers containing lower levels of LA (2.1 to 3.4 g/L) have also been reported (SNAUWAERT *et al.*, 2016). The LA concentration found was 0.38 ± 0.02 in beer, slightly higher than in green beer. The study by Byakika *et al.* (2019) investigated the ability to reduce aflatoxin contamination with the use of lactic acid (LAB) starters and considered the use of LAB in aflatoxin binding to be a viable and safe strategy, in which some LAB strains can bind aflatoxins to their cell walls or cell wall components, thus decreasing the bioavailability of toxins.

Meanwhile, the pH values in the contaminated and uncontaminated beer were found to be below 3.3, without much variation. Wheat beers produced with the yeast used (WB-06) had lower pH values when compared to different strains of yeast (LBCM1078), on the scale of 4.32 (ARAÚJO *et al.*, 2018). The study carried out by Bovo *et al.* (2015) investigated the adsorption of AFB₁ by beer fermentation residues (BFR) and the result ranged from 45.5% to 69.4% at pH 3.0 and from 24.0% to 63.8% at pH 6.0. The highest percentages of AFB₁ binding at both pH values were achieved with products containing hydrolyzed yeast cells or yeast cell walls rather than intact cells. The percentages of BFR AFB₁ binding were $55.0 \pm 5.0\%$ at pH 3.0 and $49.2 \pm 4.5\%$ at pH 6.0. In this case, the presence of lactic acid and the acid pH observed in the samples contributed to the reduction in the concentration of aflatoxin, with adsorption of the same in the fermentation residues and binding of the same in the cell walls of the LAB.

Succinic and acetic acids are also produced in the course of fermentation. Unpasteurized beer increases the incidence of Gram-negative anaerobic bacteria, whose spoilage includes the production of acetic acid and propionic acid (OLANIRAN *et al.*, 2017). An increase in acetic

acid was observed between samples M and B, on the other hand, the values of propionic acid were reduced between these samples. The acetic acid values found in the study by Paula *et al.* (2021) in wheat craft beer samples were 0.03 g/L, while those in this study were considerably lower, on a scale of 10^3 (1.04 mg/L). The generation of acetic acid appears to be intensified by the lack of fermentable sugar. High concentrations of acetic acid can be avoided in non-beneficial wort production by using the β -galactosidase enzyme, which releases glucose from malt starch, and to avoid excessive stress. Most brewer's yeasts only produce the enzymes α -glucosidase and maltose permease after the adaptation phase, allowing the consumption of maltose (PAULA *et al.*, 2021).

4.5 Color, EST and density in samples of craft wheat beer

The L^* value in the case of $L^*a^*b^*$ might range from 0 to 100; the higher the L^* , the lighter the sample. The values of a^* and b^* can range from -100 to +100. Smaller a^* stands for green, higher red, and smaller b^* stands for blue, higher yellow (KOREN *et al.*, 2020).

In the analyzed sample, it can be seen that the L^* values became smaller in the different production stages, in which the final sample (B) has the lowest identified value (14.61). The lower luminosity is identified in cloudier beers with lower EBC index, while the values of a^* , which represent the green to red color axis, ranged from -0.61 (M) to -0.22 (GB). The negative values indicated a perception of the green color, which is due to the level of roasting used in the production of craft beer. For the parameter b^* , a tendency towards yellow coloration was observed, but not very expressive and varied from 0.90 (M) to 0.46 (SW). The decrease in the b^* value of some samples of craft beers led to a reddish color with a brown trace, as a function of the a^* value of the color (KOREN *et al.*, 2020).

Jardim *et al.* (2018) highlighted some quality condition parameters in craft beers that are close to those found in this study and that are in accordance with international quality guidelines. In general, craft beer samples showed similar values in density, color and pH, but differences were observed in acidity and dry extract, when compared to craft beers analyzed by the authors.

4.4 *Effects of fermentation on cell viability*

The table 6 data can better have observed in the figure 2. The total number of cells was in the range of 10^8 cell/ml for each batch of fermentation. The viability of the yeasts was variable according to the presence of the contaminant in the selected samples (Figure 2). The viability was low at the beginning of the first fermentation and on the third day, growing again until the collection carried out in the day 5. The contamination modified the numbers of viable cells both in the increase and in the decrease, proportionally, being similar only in the day 5 samples.

The initial yeast concentration was relatively high and the following growth was modest (10^8 cell/mL). Viability was poor at the beginning of the first fermentation when the dry inoculum was utilized, indicating that before the culture can operate well, it must return to its fully functional state and adapt to its new environment. Higher viability was produced as a result of the cells' adaptation to the fermentation environment. This viability was well maintained throughout the fermentation batch and returned to the observed value on day two. It has been demonstrated that the yeast can maintain its viability throughout the fermentation (PRADO *et al.*, 2020)

The importance of yeast viability increases during the early phases of fermentation, when high metabolic activity rather than yeast growth or multiplication determines the fermentative

capability. In addition to influencing population expansion, the early conditions of yeast cells have an impact on the rates of ethanol production and nutrient absorption. Due to a lack of substrate and a rise in ethanol concentration, there were less viable cells after 72 hours. The composition of the wort is one of the most significant aspects that can affect the yeast's capacity to ferment and can vary depending on the materials used and the manufacturing methods used (NUNES *et al.*, 2020).

Microorganisms cell walls are primarily made of polysaccharides, proteins, and lipids, which provide a variety of functional groups (carboxyl, hydroxyl, phosphate, and amino groups) as well as hydrophobic adsorption sites (aliphatic carbon chains and aromatic rings) for the potential binding of mycotoxin. Because their cell walls include mannoproteins and -glucans, yeast biomass can be a useful source of mycotoxin adsorbent material (WANG *et al.*, 2020).

5 CONCLUSIONS

This study investigated aflatoxin B₁ and physicochemical parameters of crafted wheat beer from contaminated wheat malt. The results support the principles that (i) aflatoxin resists the craft beer production process with considerable concentrations in the final sample, (ii) the presence of aflatoxin alters the physicochemical parameters of the beer, proven from the phenolic profile, sugars and others (iii) wheat craft beer requires a quality control of the raw material, aiming to guarantee non-contamination by mycotoxins and (iv) there is, therefore, a role of aflatoxins present in wheat malt in the nutritional value and quality profile of wheat craft beer.

Regarding the determination of AFB₁, our results demonstrate that the levels of AFB₁ varied throughout the manufacture of wheat craft beer, being present in significant amounts in

the final product, resisting the production process. The presence of this aflatoxin becomes worrying due to its toxicity to the organism and the possibility of causing several health problems. Future work is needed to investigate the effects of aflatoxin B₂ in this context and how these changes during the production process can be controlled.

REFERENCES

- ACERVA Brasil. Associação dos Cervejeiros Caseiros Artesanais do Brasil. 2021. Disponível em: <https://abracerva.com.br/>. Acesso em: 06 jun. 2021.
- ADEYEYE, Samuel Ayofemi Olalekan. Mycotoxins in foods: impact on health. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. Elsevier, 2022. p. 261-271.
- ALAM, Sadia; NISA, Sobia; DAUD, Sajeela. Mycotoxins in Environment and Its Health Implications. In: **Hazardous Environmental Micro-pollutants, Health Impacts and Allied Treatment Technologies**. Springer, Cham, 2022. p. 289-318.
- ÁLVAREZ-SEGOVIA, K.; GARCÍA-VARELA, R.; GARCÍA, H. S.; AGUILAR-TOALÁ, J. E.; DEL CARMEN ESTRADA-MONTOYA, M.; VALLEJO-CORDOBA, B.; *et al.* Determination of AFB₁ in clear lager beer samples from Mexico and the possible correlation between physicochemical parameters and AFB₁ levels. **Journal of Consumer Protection and Food Safety**, v. 15, n. 2, p. 121-133, 2020.
- AMBRA, Roberto; PASTORE, Gianni; LUCCHETTI, Sabrina. The role of bioactive phenolic compounds on the impact of beer on health. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 486, 2021.
- ANDERSON, Hailee E.; LIDEN, T., BERGER, B. K., & SCHUG, K. A. Target profiling of beer styles by their iso- α -acid and phenolic content using liquid chromatography–

quadrupole time-of-flight–mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 44, n. 14, p. 2764-2772, 2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. RE nº 899, de 29 de maio de 2003.

AOAC. Association Of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the AOAC International**. 19. ed. Washington: AOAC; 2012.

ARAÚJO, T. M.; SOUZA, M. T.; DINIZ, R. H. S.; YAMAKAWA, C. K.; SOARES, L. B.; LENCZAK, J. L., *et al.* Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 111, n. 10, p. 1749-1766, 2018.

ARZANDEH, S.; JINAP, S. Effect of initial aflatoxin concentration, heating time and roasting temperature on aflatoxin reduction in contaminated peanuts and process optimisation using response surface modelling. **International journal of food science & technology**, v. 46, n. 3, p. 485-491, 2011.

BAUER, Julia I.; GROSS, M.; GOTTSCHALK, C.; USLEBER, E. Investigations on the occurrence of mycotoxins in beer. **Food Control**, v. 63, p. 135-139, 2016.

BASTGEN, Nele; GINZEL, Michel; TITZE, Jean. Precision of a small brew house by determining the repeatability of different brews to guarantee the product stability of the beer. **Beverages**, v. 5, n. 4, p. 67, 2019.

BERTUZZI, T. *et al.* Targeted healthy compounds in small and large-scale brewed beers. **Food chemistry**, v. 310, p. 125935, 2020.

BETTENHAUSEN, Harmonie M. *et al.* Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. **Food research international**, v. 113, p. 487-504, 2018.

- BOVO, Fernanda; FRANCO, L. T., ROSIM, R. E., BARBALHO, R., & OLIVEIRA, C. A. F. D. In vitro ability of beer fermentation residue and yeast-based products to bind aflatoxin B 1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 577-581, 2015.
- BYAKIKA, Stella; MUKISA, I. M., WACOO, A. P., KORT, R., BYARUHANGA, Y. B., & MUYANJA, C. Potential application of lactic acid starters in the reduction of aflatoxin contamination in fermented sorghum-millet beverages. **International Journal of Food Contamination**, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2019.
- BYEON, Yang Soo; LIM, S. T.; KIM, H. J.; KWAK, H. S.; KIM, S. S. Quality Characteristics of Wheat Malts with Different Country of Origin and Their Effect on Beer Brewing. **Journal of Food Quality**, v. 2021, 2021.
- CAMPAGNOLLO, F. B.; FRANCO, L. T.; ROTTINGHAUS, G. E.; KOBASHIGAWA, E.; LEDOUX, D. R.; DAKOVIĆ, A.; OLIVEIRA, C. A. In vitro evaluation of the ability of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* to bind mycotoxins. **Food research international**, v. 77, p. 643-648, 2015.
- CARVALHO, Daniel O.; GUIDO, Luís F. A review on the fate of phenolic compounds during malting and brewing: Technological strategies and beer styles. **Food Chemistry**, v. 372, p. 131093, 2022.
- CHAN, M. Z. A.; CHUA, J. Y.; TOH, M.; LIU, S. Q. Survival of probiotic strain *Lactobacillus paracasei* L26 during co-fermentation with *S. cerevisiae* for the development of a novel beer beverage. **Food microbiology**, v. 82, p. 541-550, 2019.
- CHEIRAN, Kamila P.; RAIMUNDO, V. P., MANFROI, V., ANZANELLO, M. J., KAHMANN, A., RODRIGUES, E., & FRAZZON, J. Simultaneous identification of

low-molecular weight phenolic and nitrogen compounds in craft beers by HPLC-ESI-MS/MS. **Food chemistry**, v. 286, p. 113-122, 2019.

CIOSEK, A.; FULARA, K.; HRABIA, O.; SATORA, P.; POREDA, A. Chemical composition of sour beer resulting from supplementation the fermentation medium with magnesium and zinc ions. **Biomolecules**, v. 10, n. 12, p. 1599, 2020.

CORTESE, M.; GIGLIOBIANCO, M. R.; PEREGRINA, D. V.; SAGRATINI, G.; CENSI, R.; DI MARTINO, P. Quantification of phenolic compounds in different types of crafts beers, worts, starting and spent ingredients by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1612, p. 460622, 2020.

DACK, R. E.; BLACK, G. W.; KOUTSIDIS, G. The effect of Maillard reaction products and yeast strain on the synthesis of key higher alcohols and esters in beer fermentations. **Food chemistry**, v. 232, p. 595-601, 2017.

DE SIMONE, Nicola; RUSSO, P.; TUFARIELLO, M.; FRAGASSO, M.; SOLIMANDO, M.; CAPOZZI, V.; *et al.* Autochthonous Biological Resources for the Production of Regional Craft Beers: Exploring Possible Contributions of Cereals, Hops, Microbes, and Other Ingredients. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1831, 2021.

DUTRA, M. C. P.; RODRIGUES, L. L.; DE OLIVEIRA, D.; PEREIRA, G. E.; DOS SANTOS LIMA, M. Integrated analyses of phenolic compounds and minerals of Brazilian organic and conventional grape juices and wines: Validation of a method for determination of Cu, Fe, and, Mn. **Food Chemistry**, v. 269, p. 157- 165, 2018.

EATON, Brian. An Overview of Brewing. **Handbook of Brewing**, p. 53-66, 2017.

EC. European Commission. **Official Journal of the European Communities**, L221/8-36, 17 de Agosto de 2002. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/legal->

[content/PT/TXT/PDF/?uri=OJ:L:2002:221:FULL&from=EN](#). Acesso em: 23 maio, 2022.

EINFALT, Daniel. Barley-sorghum craft beer production with *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima* yeast strains. **European Food Research and Technology**, v. 247, n. 2, p. 385-393, 2021.

ERHARDT, N.; MARTIN-RIOS, C.; BOLTON, J.; LUTH, M. Doing Well by Creating Economic Value through Social Values among Craft Beer Breweries: A Case Study in Responsible Innovation and Growth. **Sustainability**, v. 14, n. 5, p. 2826, 2022.

FLAVIIS, R.; SANTARELLI, V.; MUTARUTWA, D.; GIULIANI, M.; SACCHETTI, G. Volatiles profile of ‘Blanche’ wheat craft beer as affected by wheat origin: A chemometric study. **Food Chemistry**, v. 385, p. 132696, 2022.

GONÇALVES, A.; PALUMBO, R.; GUIMARÃES, A.; GKRILLAS, A.; DALL’ASTA, C.; DORNE, J. L.; *et al.* The route of mycotoxins in the grape food chain. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 71, n. 2, p. 89-104, 2020.

GONÇALVES, J. N.; DE SOUZA, P. G.; BARRETO, E. D. C. M.; DE LIMA, J. S.; DA SILVA, V. B. Elaboração de cerveja artesanal do estilo caxiri beer com adição de camu-camu (*Myrciaria dubia*). **Brazilian Journal of Science**, v. 1, n. 4, p. 101-108, 2022.

HEUBERGER, Adam L.; BROECKLING, C. D., SEDIN, D., HOLBROOK, C., BARR, L., KIRKPATRICK, K.; PRENNI, J. E. Evaluation of non-volatile metabolites in beer stored at high temperature and utility as an accelerated method to predict flavour stability. *Food Chemistry*, v. 200, p. 301-307, 2016.

- HOPFER, Helene; MCDOWELL, E. H.; NIELSEN, L. E.; HAYES, J. E. Preferred beer styles influence both perceptual maps and semantic descriptions of dry hops. **Food Quality and Preference**, v. 94, p. 104337, 2021.
- JAEGER, S. R.; WORCH, T.; PHELPS, T.; JIN, D.; CARDELLO, A. V. Preference segments among declared craft beer drinkers: Perceptual, attitudinal and behavioral responses underlying craft-style vs. traditional-style flavor preferences. **Food Quality and Preference**, v. 82, p. 103884, 2020.
- JANIK, E.; NIEMCEWICZ, M.; CEREMUGA, M.; STELA, M.; SALUK-BIJAK, J.; SIADKOWSKI, A.; BIJAK, M. Molecular aspects of mycotoxins—A serious problem for human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8187, 2020.
- JARDIM, C. C.; SOUZA, D.; MACHADO, I. C. K.; PINTO, L.M. N.; RAMOS, R. C. S.; GARAVAGLIA, J. Sensory profile, consumer preference and chemical composition of craft beers from Brazil. **Beverages**, v. 4, n. 4, p. 106, 2018.
- JOUBRANE, K.; MNAYER, D.; EL KHOURY, A.; EL KHOURY, A.; AWAD, E. Co-occurrence of aflatoxin B1 and ochratoxin A in Lebanese stored wheat. **Journal of Food Protection**, v. 83, n. 9, p. 1547-1552, 2020.
- KARLOVSKY, P.; SUMAN, M.; BERTHILLER, F.; DE MEESTER, J.; EISENBRAND, G.; PERRIN, I.; *et al.* Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. **Mycotoxin research**, v. 32, n. 4, p. 179-205, 2016.
- KOREN, D.; VECSEI, B. H.; KUN-FARKAS, G.; URBIN, A.; NYITRAI, A.; SIPOS, L. How to objectively determine the color of beer? **Journal of food science and technology**, v. 57, n. 3, p. 1183-1189, 2020.

LEDLEY, Andrew J.; ELIAS, R. J.; HOPFER, H.; COCKBURN, D. W. A Modified Brewing Procedure Informed by the Enzymatic Profiles of Gluten-Free Malts Significantly Improves Fermentable Sugar Generation in Gluten-Free Brewing. **Beverages**, v. 7, n. 3, p. 53, 2021.

LENTZ, Michael. The impact of simple phenolic compounds on beer aroma and flavor. **Fermentation**, v. 4, n. 1, p. 20, 2018.

LIU, L.; WANG, J.; LEVIN, M. J.; SINNOTT-ARMSTRONG, N.; ZHAO, H.; ZHAO, Y.; SHAO, J.; DI, N.; ZHANG, T. The origins of specialized pottery and diverse alcohol fermentation techniques in Early Neolithic China. **PNAS**, v. 116, n. 26, p. 12767–12774, 2019.

LIU, Y.; GALANI YAMDEU, J. H.; GONG, Y. Y.; ORFILA, C. A review of postharvest approaches to reduce fungal and mycotoxin contamination of foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 4, p. 1521-1560, 2020.

LIU, Xuwei; LE BOURVELLEC, C., GUYOT, S., & RENARD, C. M. Reactivity of flavanols: Their fate in physical food processing and recent advances in their analysis by depolymerization. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 5, p. 4841-4880, 2021.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário da Cerveja 2020. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/anuario-da-cerveja-2019/view>. Acesso em: 03 jan. 2022.

- MARCHESE, S.; POLO, A.; ARIANO, A.; VELOTTO, S.; COSTANTINI, S.; SEVERINO, L. Aflatoxin B1 and M1: Biological Properties and Their Involvement in Cancer Development. **Toxins (Basel)**, v. 10, n. 6, 2018.
- MARTÍNEZ, A.; VEGARA, S.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; MARTÍ, N.; VALERO, M.; MICOL, V.; SAURA, D. Kinetic changes of polyphenols, anthocyanins and antioxidant capacity in forced aged hibiscus ale beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 58-65, 2017.
- MARTINS, P. A. **Análises físico-químicas utilizadas nas empresas de Vinificação necessárias ao acompanhamento do processo de elaboração de vinhos brancos.** Rio Grande do Sul, Título de graduação, CEFET-BG, 2007. 48 p.
- MATRAXIA, Michele; ALFONZO, A.; PRESTIANNI, R.; FRANCESCA, N.; GAGLIO, R.; TODARO, A.; *et al.* Non-conventional yeasts from fermented honey by-products: Focus on *Hanseniaspora uvarum* strains for craft beer production. **Food Microbiology**, v. 99, p. 103806, 2021.
- MATSUBARA, KAORI A; PLATH, R A. **Desenvolvimento de Cerveja Artesanal de Trigo adicionada de Gengibre** (*Zingiberofficinale* Roscoe). 2014. 51f. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso Superior de Tecnologia em Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2014.
- MEBAK (MITTELEUROPÄISCHE BRAUTECHNISCHE ANALYSENKOMMISSION). **Raw materials - barley, adjuncts, malt, hops and hop products - collection of brewing analysis methods of the Mitteleuropäische Brautechnische Analysenkommission (MEBAK)**. 2. ed. Nuremberg: Fachverlag Hans Carl 2017.

- MOURA-NUNES, Nathália et al. Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. **Food chemistry**, v. 199, p. 105-113, 2016.
- NIGUSSIE, A.; BEKELE, T.; FEKADU GEMEDE, H.; ZEWDU WOLDEGIORGIS, A. Level of aflatoxins in industrially brewed local and imported beers collected from Ethiopia market. **Cogent Food & Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1453317, 2018.
- NUNES, C. SO.; DA SILVA, M. L.; CAMILLOTO, G. P.; MACHADO, B. A.; HODEL, K. V.; KOBLITZ, M. G. B.; *et al.* Potential Applicability of Cocoa Pulp (*Theobroma cacao* L) as an Adjunct for Beer Production. **The Scientific World Journal**, v. 2020, 2020.
- OLANIRAN, A. O.; HIRALAL, L.; MOKOENA, M. P.; PILLAY, B. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 1, p. 13-23, 2017.
- OSORIO-PAZ, Ixchel; BRUNAUER, Regina; ALAVEZ, Silvestre. Beer and its non-alcoholic compounds in health and disease. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 60, n. 20, p. 3492-3505, 2020.
- PADILHA, C. V. S.; BIASOTO, A. C. T.; CORRÊA, L. C.; LIMA, M. S.; PEREIRA, G. E. Phenolic compounds profile and antioxidant activity of comercial tropical red wines (*Vitis vinifera* L.) from São Francisco Valley, Brazil. **Journal of Food Biochemistry**, v. 41, p. 1-9, 2017.
- PAIX, Murilo Dabruzzo. Uma avaliação qualitativa da presença de micotoxinas e micro-organismos toxigênicos em insumos e em cervejas artesanais. Tese de Doutorado.

Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2019. 132f.

PASCARI, X.; RAMOS, A. J.; MARÍN, S.; SANCHÍS, V. Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. **Food Research International**, v. 103, p. 121-129, 2018.

PAULA, Breno Pereira; DE SOUZA LAGO, H., FIRMINO, L., JÚNIOR, W. J. F. L., CORRÊA, M. F. D., GUERRA, A. F.; *et al.* Technological features of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* for potential probiotic wheat beer development. **LWT**, v. 135, p. 110233, 2021.

PEYER, L. C.; BELLUT, K.; LYNCH, K. M.; ZARNKOW, M.; JACOB, F.; DE SCHUTTER, D. P.; ARENDT, E. K. Impact of buffering capacity on the acidification of wort by brewing-relevant lactic acid bacteria. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 4, p. 497-505, 2017.

PETRÓN, M. J. ANDRÉS, A. I.; ESTEBAN, G.; TIMÓN, M. L. Study of antioxidant activity and phenolic compounds of extracts obtained from different craft beer by-products. **Journal of Cereal Science**, v. 98, p. 103162, 2021.

PFERDMENGES, Larissa E.; SCHRÖTER, A., LOHMAYER, R., STRIEGEL, L., RYCHLIK, M., MÜLLER, A. *et al.* Characterization of the nutrient composition of German beer styles for the German nutrient database. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 105, p. 104181, 2022.

PHAN, Lien Thi Kim; TRAN, T. M.; DE BOEVRE, M.; JACXSENS, L.; EECKHOUT, M.; DE SAEGER, S. Impact of Season, Region, and Traditional Agricultural Practices on

Aflatoxins and Fumonisin Contamination in the Rice Chain in the Mekong Delta, Vietnam. **Toxins**, v. 13, n. 9, p. 667, 2021.

PRADO, Cleiton D.; MANDRUJANO, G. P.; SOUZA, J.; SGOBBI, F. B.; NOVAES, H. R.; DA SILVA, J. P.; *et al.* Physiological characterization of a new thermotolerant yeast strain isolated during Brazilian ethanol production, and its application in high-temperature fermentation. **Biotechnology for biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1-15, 2020.

RATERS, M.; MATISSEK, R. Thermal stability of aflatoxin B1 and ochratoxin A. **Mycotoxin research**, v. 24, n. 3, p. 130-134, 2008.

RUIZ-MEDINA, Antonio; FERNÁNDEZ-DE CÓRDOVA, Ma Luisa. Aflatoxin B1 in beer at different Stages of Production. In: **Processing and impact on active components in food**. Academic Press, 2015. p. 517-523.

SALANȚĂ, Liana Claudia; COLDEA, T. E.; IGNAT, M. V.; POP, C. R.; TOFANĂ, M.; MUDURA, E.; *et al.* Non-alcoholic and craft beer production and challenges. **Processes**, v. 8, n. 11, p. 1382, 2020.

SCHABO, D. C., MARTINS, L. M., IAMANAKA, B. T., MACIEL, J. F., TANIWAKI, M. H., SCHAFFNER, D. W.; MAGNANI, M. Modeling aflatoxin B1 production by *Aspergillus flavus* during wheat malting for craft beer as a function of grains steeping degree, temperature and time of germination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, 108777, 2020a.

SCHABO, D. C., MARTINS, L. M., MACIEL, J. F., IAMANAKA, B. T., TANIWAKI, M. H., SCHAFFNER, D. W.; MAGNANI, M. Production of aflatoxin B1 and B2 by *Aspergillus flavus* in inoculated wheat using typical craft beer malting conditions. **Food Microbiology**, v. 89, 103456, 2020b.

SCHABO, D. C.; FREIRE, L.; SANT'ANA, A. S.; SCHAFFNER, D. W.; MAGNANI, M.

Mycotoxins in artisanal beers: An overview of relevant aspects of the raw material, manufacturing steps and regulatory issues involved. **Food Research International**, v. 141, p. 110-114, 2021.

SHI, Ting-Ting; CHEN, S. J.; CHEN, Y. F.; GUO, X. W.; XIAO, D. G. Reduced production of diacetyl by overexpressing BDH2 gene and ILV5 gene in yeast of the lager brewers with one ILV2 allelic gene deleted. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 397-405, 2017.

SILVA, Bibiana; SOUZA, Manuel M.; BADIALE-FURLONG, Eliana. Antioxidant and antifungal activity of phenolic compounds and their relation to aflatoxin B1 occurrence in soybeans (*Glycine max* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 3, p. 1256-1264, 2020.

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

SNAUWAERT, I.; ROELS, S. P.; VAN NIEUWERBURGH, F.; VAN LANDSCHOOT, A.; DE VUYST, L.; VANDAMME, P. Microbial diversity and metabolite composition of Belgian red-brown acidic ales. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 1-11, 2016.

SÖYLEMEZ, Tuncay; YAMAÇ, Mustafa; YILDIZ, Zeki. Statistical optimization of cultural variables for enzymatic degradation of aflatoxin B1 by *Panus neostrius*. **Toxicon**, v. 186, p. 141-150, 2020.

TÓFOLI, RODOLFO JOSÉ. **Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química de cervejas comerciais e artesanais**. Instituto Municipal de Ensino Superior do

Município de Assis–Imesa e Fundação Educacional do Município de Assis–Fema, Assis, 2014.

TORABI, Samane; SATARI, Behzad; HASSAN-BEYGI, Seyed Reza. Process optimization for dilute acid and enzymatic hydrolysis of waste wheat bread and its effect on aflatoxin fate and ethanol production. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 11, n. 6, p. 2617-2625, 2021.

VIANA, A. C.; PIMENTEL, T. C.; DO VALE, R. B.; CLEMENTINO, L. S.; FERREIRA, E. T. J.; MAGNANI, M.; LIMA, M. S. American pale Ale craft beer: Influence of brewer's yeast strains on the chemical composition and antioxidant capacity. **LWT**, v. 152, p. 112317, 2021.

VILLACRECES, Salvador; BLANCO, Carlos A.; CABALLERO, Isabel. Developments and characteristics of craft beer production processes. **Food Bioscience**, p. 101495, 2021.

WANNENMACHER, Julia; GASTL, Martina; BECKER, Thomas. Phenolic substances in beer: Structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and beer quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 4, p. 953-988, 2018.

YANG, Dongsheng; GAO, Xuan. Research progress on the antioxidant biological activity of beer and strategy for applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 110, p. 754-764, 2021.

ZAHRA, AL-Timimi. A comparative study of determination the spectral characteristics of serum total protein among laser system and spectrophotometric: advantage and limitation of suggested methods. **Current Analytical Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 583-590, 2019.

ZHAO, H.; CHEN, W., LU, J.; ZHAO, M. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1150-1158, 2010.

Figures

Figure 1. Evolution of sugars and alcohols during alcoholic fermentation of craft wheat beer

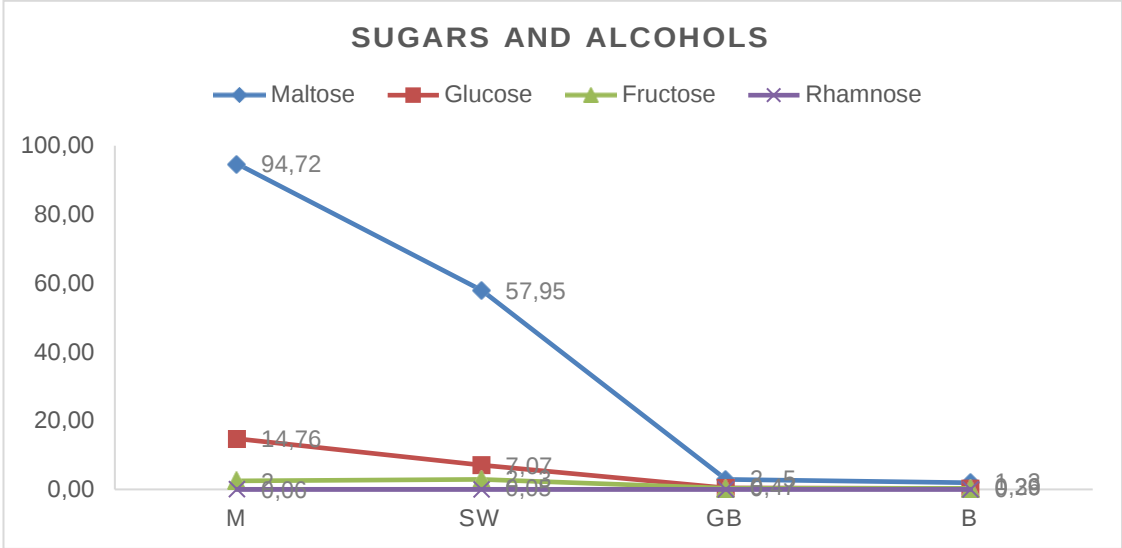
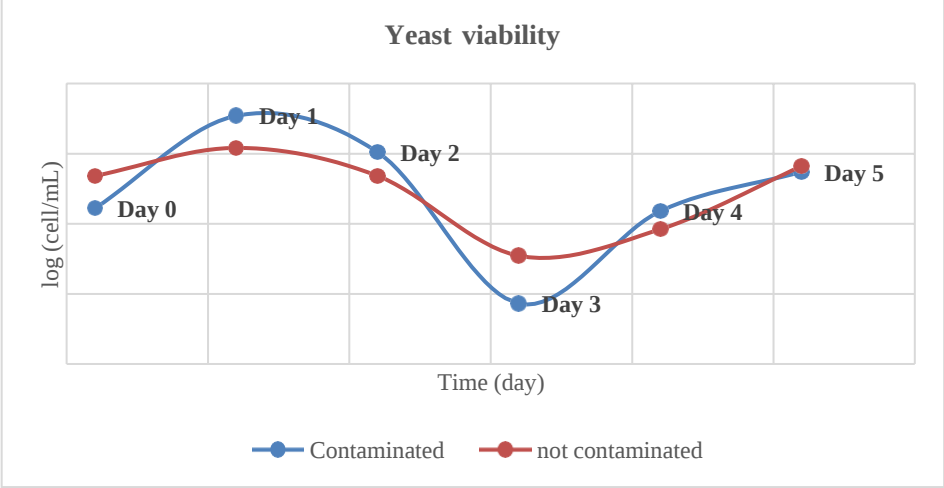


Figure 2. Yeast viability during six days sample in contaminated and not contaminated yeast



Tables

Table 1. Description of beer production steps and corresponding code.

sample code	Sample	Composition	Stage of the beer production process
WM	wheat malt	Wheat malt contaminated with AFB1	Feedstock
MM	ground malt	Wheat malt contaminated with AFB1 and ground mycotoxin-free barley malt	Milling
M	Wort	Ground malts added with water and after mashing (43 °C, 52 °C, 66 °C and 78 °C)	mash
SG	spent grain	Grains after wort filtration	filtration
SW	sweet wort	Wort after discarding the filtered grains	Boil
GB	green beer	Hopped wort, cooled and added with yeast	Fermentation
SY	waste yeast	Decanted and discarded yeast (trub)	Maturation
B	Beer	matured beer	Maturation

Table 2. Levels ($\mu\text{g/kg}$ or $\mu\text{g/L}$) of aflatoxin B₁ (AFB₁) in each sample collected during manufacture of wheat craft wheat beer made with contaminated wheat malt.

Sample code	AFB ₁ ($\mu\text{g/L}$ or $\mu\text{g/kg}$)
	mean $\pm$ SD
WM	1.23 $\pm$ 0.13 ^a
MG	1.01 $\pm$ 0.26 ^b
SG	0.71 $\pm$ 0.17 ^{ab}
SW	0.83 $\pm$ 0.03 ^{ab}
GB	0.34 $\pm$ 0.00 ^c
SY	0.11 $\pm$ 0.03 ^c
B	0.22 $\pm$ 0.00 ^d

WM: wheat malt; MG: malt grit; M: mash, SG: spent grains; SW: sweet wort; GB: green beer; SY: spent yeast; B: beer; *: $\mu\text{g/L}$; ^{a-d}: different superscript small letters in the same column denote difference ($p < 0.05$) based on Tukey's test.

Table 3. Sugars and alcohol detected in different samples collected during the production of craft wheat beer

Sugars (mg/L)	Sample code			
	M	SW	GB	B
Maltose	94.72 ± 1.00 ^a	57.95 ± 1.00 ^b	2.85 ± 0.02 ^c	1.93 ± 0.09 ^c
Glucose	14.76 ± 0.02 ^a	7.07 ± 0.03 ^b	0.47 ± 0.03 ^c	0.29 ± 0.03 ^d
Fructose	2.56 ± 0.09 ^b	2.93 ± 0.08 ^a	0.40 ± 0.15 ^c	0.36 ± 0.08 ^c
Rhamnose	0.06 ± 0.02 ^a	0.05 ± 0.03 ^a	< LOD	< LOD
Alcohols (mg/L)				
Glycerol	0.19 ± 0.01 ^d	0.48 ± 0.02 ^c	2.78 ± 0.03 ^b	2.83 ± 0.02 ^a
Ethanol	< LOD	1.28 ± 0.03 ^c	41.37 ± 0.04 ^b	42.51 ± 0.02 ^a

^{a-d}Mean ± standard deviation with different letters in the same row indicate significant differed by Tukey's test (p < 0.05). M (Wort); SW (Sweet wort); GB (Green beer); B (Beer)

Table 4. Total phenolics content compounds detected in different samples collected during the production of craft wheat beer

Phenolic compounds (mg/L)	Sample code			
	M	SW	GB	B
<i>Phenolic acids</i>				
Syringic acid	0.65 ± 0.02 ^b	0.23 ± 0.03 ^c	1.44 ± 0.02 ^a	1.46 ± 0.02 ^a
Gallic acid	0.81 ± 0.03 ^b	0.88 ± 0.02 ^a	0.24 ± 0.02 ^c	0.23 ± 0.02 ^c
Caftaric acid	0.41 ± 0.02 ^d	1.60 ± 0.02 ^c	1.79 ± 0.02 ^b	1.88 ± 0.02 ^a
Chlorogenic acid	4.06 ± 0.03 ^a	2.35 ± 0.03 ^b	0.71 ± 0.02 ^c	0.67 ± 0.02 ^c
Caffeic acid	0.05 ± 0.02 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.06 ± 0.02 ^a
<i>Flavanols</i>				
Catechin	3.74 ± 0.04 ^b	2.44 ± 0.07 ^c	0.34 ± 0.03 ^d	15.04 ± 0.02 ^a
Epigallocatechin gallate	0.15 ± 0.02 ^c	1.08 ± 0.02 ^a	0.30 ± 0.02 ^b	0.05 ± 0.03 ^d
Epicatechin	0.54 ± 0.02 ^c	0.38 ± 0.02 ^d	0.77 ± 0.03 ^b	0.99 ± 0.02 ^a
Epicatechin gallate	1.05 ± 0.02 ^a	0.69 ± 0.07 ^c	0.99 ± 0.02 ^a	0.82 ± 0.03 ^b
<i>Proanthocyanidins</i>				
Procyanidin A2	0.87 ± 0.02 ^c	0.91 ± 0.03 ^c	53.69 ± 0.02 ^b	56.05 ± 0.03 ^a
Procyanidin B1	0.32 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.03 ^b	0.14 ± 0.03 ^c	0.12 ± 0.02 ^c
Procyanidin B2	0.61 ± 0.08 ^a	0.45 ± 0.02 ^b	0.48 ± 0.03 ^b	0.43 ± 0.03 ^b
<i>Stilbens</i>				
Trans-Resveratrol	0.12 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.03 ^a	0.16 ± 0.02 ^a	0.17 ± 0.02 ^a
Cis-Resveratrol	0.18 ± 0.03 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
<i>Flavanones</i>				
Naringenin	0.18 ± 0.02 ^a	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
<i>Flavonols</i>				
Myricetin	0.20 ± 0.02 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	0.18 ± 0.02 ^{ab}	0.14 ± 0.03 ^b
Rutin	0.06 ± 0.02 ^a	0.06 ± 0.05 ^a	0.09 ± 0.06 ^a	0.09 ± 0.02 ^a
Quercetin 3-Glucoside	0.11 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.02 ^a	0.13 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.03 ^a
Kaempferol 3-glucoside	0.04 ± 0.02 ^a	0.05 ± 0.02 ^a	0.05 ± 0.03 ^a	0.04 ± 0.03 ^a
Total phenolic compounds	14,15	11,85	61,50	78,36

^{a-d}Mean ± standard deviation with different letters in the same row indicate significant differed by Tukey's test (p < 0.05). M (Wort); SW (Sweet wort); GB (Green beer); B (Beer)

Table 5. Concentration of organic acid detected in different samples collected during the production of craft wheat beer

Organic Acids (mg/L)	Sample code			
	M	SW	GB	B
Citric acid	0.35 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.01 ^b	0.33 ± 0.02 ^a	0.37 ± 0.02 ^a
Malic acid	0.75 ± 0.02 ^a	0.51 ± 0.02 ^b	0.40 ± 0.02 ^c	0.45 ± 0.02 ^c
Lactic acid	0.80 ± 0.03 ^a	0.21 ± 0.02 ^c	0.33 ± 0.04 ^b	0.38 ± 0.02 ^b
Succinic acid	0.15 ± 0.03 ^b	0.14 ± 0.06 ^b	0.33 ± 0.06 ^a	0.41 ± 0.03 ^a
Formic acid	0.59 ± 0.15 ^a	0.27 ± 0.01 ^c	0.28 ± 0.02 ^{bc}	0.32 ± 0.03 ^b
Acetic acid	0.66 ± 0.01 ^b	0.32 ± 0.03 ^c	0.94 ± 0.08 ^a	1.04 ± 0.04 ^a
Propionic acid	5.41 ± 0.07 ^a	1.60 ± 0.03 ^b	0.28 ± 0.02 ^c	0.32 ± 0.03 ^c

^{a-d}Mean ± standard deviation with different letters in the same row indicate significant differed by Tukey's test ($p < 0.05$). M (Wort); SW (Sweet wort); GB (Green beer); B (Beer)

Table 6. Quality parameters of the craft wheat beer

		Sample code			
		M	SW	GB	B
pH		6.00 ± 0.10 ^a	5.93 ± 0.15 ^a	4.10 ± 0.10 ^b	3.20 ± 0.10 ^c
Acidity		0.34 ± 0.04 ^a	0.32 ± 0.01 ^a	0.25 ± 0.00 ^b	0.19 ± 0.00 ^b
Color	L*	19.42 ± 0.07 ^a	16.10 ± 0.10 ^b	14.96 ± 0.22 ^c	14.61 ± 0.16 ^c
	a*	-0.61 ± 0.01 ^c	-0.37 ± 0.07 ^{ab}	-0.22 ± 0.05 ^a	-0.31 ± 0.01 ^a
	b*	0.90 ± 0.03 ^a	0.46 ± 0.00 ^c	0.73 ± 0.01 ^b	0.71 ± 0.02 ^b
TS		14.32 ± 0.18 ^b	18.13 ± 0.11 ^a	9.88 ± 0.060 ^c	3.35 ± 0.086 ^d

^{a-d} : Different superscript small letters in the same row for the different samples denotes relation significant ($p < 0.05$), based on Tukey's test.

Table 7. Density values detected in different times collected during the production of craft wheat beer previously contaminated

Density	wheat craft beer			
	24h	72h	120h	168h
Contaminated sample	1.05 ± 0.00 ^a	1.02 ± 0.00 ^a	1.01 ± 0.00 ^a	1.01 ± 0.00 ^a
Uncontaminated sample	1.05 ± 0.00 ^a	1.02 ± 0.00 ^a	1.01 ± 0.00 ^a	1.01 ± 0.00 ^a

a-b: Same superscript capital letters in the same row for the different samples denotes relation no-significant ($p > 0.05$), based on Tukey's test.

Table 8. Collection of samples for counting yeast cells during wort fermentation.

Sample code	Sample Composition	Fermentation time
Y	hydrated yeast	-
W1	inoculated wort	24 h
W2	inoculated wort	72 h
W3	inoculated wort	120 h
W4	inoculated wort	168 h
SY	waste yeast	192 h