



**VITOR AUGUSTO LOURENÇO SANTOS**

**Avaliação da fração volátil de cervejas artesanais durante o processo de *Dry Hopping* por Microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)**

**Lavras  
2019**

**VITOR AUGUSTO LOURENÇO SANTOS**

**Avaliação da fração volátil de cervejas artesanais durante o processo de *Dry Hopping* por Microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)**

Monografia apresentada à  
Universidade Federal de Lavras,  
como parte das exigências do  
Curso de Química, para a  
obtenção do título de Licenciado.

Orientador: Márcio Pozzobon  
Pedroso

**Lavras**

**2019**

**Avaliação da fração volátil de cervejas artesanais durante o processo de *Dry Hopping* por Microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Química, para a obtenção do título de Licenciado.

APROVADO em 02 de julho de 2019.  
Dra. Miriany Avelino Moreira Fernandez UFLA  
Mestre Alex Rodrigues Silva Caetano UFLA

Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso

Orientador

**Lavras**  
**2019**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Erisvaldo e Viviane, e minha irmã, Ana Carolina pelo apoio incondicional a minha formação acadêmica, cobranças, preocupação, conselhos, paciência com a inexperiência desse filho e acima de tudo pelo amor recebido até esse momento.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Química, pela oportunidade de formação acadêmica e CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Ao Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso pelos ensinamentos, disponibilidade sempre que possível, dedicação exemplar à magistratura, pelos conselhos e pelo elevado grau de paciência com este discente procrastinador.

À Profa. Dra. Miriany Avelino Moreira Fernandez e ao Mestre Alex Rodrigues Silva Caetano por se mostrarem disponíveis a participar da banca examinadora deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Química Analítica, em especial a Letícia Fagundes, por todos os momentos compartilhados, por se mostrarem prontamente disponíveis a me auxiliar na realização deste trabalho e nunca terem perdido a compostura perante aos apelidos cuidadosamente criados e respeitosamente utilizados.

À minha namorada, Andressa, por sempre estar disposta a me ouvir e ajudar em toda e qualquer dificuldade que tenha passado, pelos conselhos, pelas risadas em conjunto e principalmente pelo amor dedicado a este ser peculiar.

Aos meus avós Maria José, Dorival, Edivaldo e Silvandira, por sempre terem me apoiado em minha jornada até onde foi possível, sempre se importando com meu futuro ofício apesar de nunca entenderem inteiramente o que é química.

Aos meus amigos que fizeram da graduação um percurso divertido e leve em meio às cobranças e expectativas dos nossos estudos.

## Resumo

A cerveja é definida como uma bebida com grau alcóolico, cuja origem do etanol é a fermentação da cevada em um meio aquoso, utilizando leveduras cujo amargor e falvorização é oriunda de lúpulos. O mercado cervejeiro brasileiro é dominado por cervejas classificadas como de massa cuja produção não inclui a intensificação de suas características odorizantes. Contudo nos últimos anos vem ocorrendo a expansão do consumo de cervejas artesanais cujo processo de produção inclui etapas adicionais a fim de singularizar a sua bebida. Um desses processos é o Dry Hopping que consiste na adição de lúpulo a frio na cerveja durante o período de maturação com o objetivo de intensificar o aroma do produto final, sem nenhuma alteração de amargor. A intensificação do aroma se dá pela fixação dos voláteis presentes no óleo essencial do lúpulo pelo contato direto entre a planta e a cerveja. Os voláteis existentes no óleo são majoritariamente Monoterpenos, Sesquiterpenos, Terpenoides e compostos sulfurados. Em tais classes há os compostos com grande impacto positivo no aroma da cerveja sendo eles o monoterpene Mirceno, os sesquiterpenos Cariofileno e Humuleno e os terpenoides Linalol e Geraniol. Este trabalho se propõe a verificar a variação da fração volátil de cervejas artesanais por meio da utilização de técnicas e métodos analíticos de preparo de amostra, separação e detecção para analisar os compostos mencionados em cervejas do tipo *American Pale Ale* (APA) e construir um perfil de variação dos mesmos ao longo do período de Dry Hopping e estabelecer um período ótimo de execução do processo. Como preparo de amostra foi utilizada a técnica de microextração em fase sólida (SPME) para extração de compostos da matriz amostral. O método de cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) foi escolhido para realizar a separação e detecção dos componentes pertinentes aos objetivos do trabalho. O perfil de variação construído apresentou um padrão misto entre crescimento e queda da presença dos analitos. O comportamento esperado da variação seria de crescimento progressivo até a estabilização em um patamar constante de presença dos analitos. Dessa forma não foi possível estabelecer um período recomendado do processo afim de se obter a maior extração possível dos voláteis estudados. Os métodos de SPME e GC-MS utilizados foram viáveis para a análise da fração volátil de cervejas APA. Contudo, otimizações tendo como objetivo a diminuição de possíveis variações relativas ao processo de extração são necessárias, para melhor compreender a modificação da fração volátil em cervejas APA.

**Palavras chave:** Cervejas artesanais, Lúpulo, Aroma, Voláteis, Microextração em fase sólida, Cromatografia gasosa.

## Lista de Figuras

Figura 1: Etapas do processo de produção de cervejas.....	7
Figura 2: Perfis dos Lúpulos Comlumbus, Hallertau Mittelfruh e Challenger e tabela com indicadores de características.....	10
Figura 3:Diagrama indicando Composição do Óleo do Lúpulo.....	13
Figura 4: Estrutura do Isopreno.....	14
Figura 5: Estruturas de terpenos importantes presentes no óleo do lúpulo.....	14
Figura 6: Compostos Oxigenados presentes no Óleo essencial do lúpulo.....	16
Figura 7: Estrutura Básica de um Cromatógrafo a gás.....	18
Figura 8: Estrutura de um amostrador utilizado em SPME.....	20
Figura 9: Estrutura Fibra SPME.....	20
Figura 10: Descrição do Procedimento de extração SPME.....	21
Figura 11: Cromatograma comparativo entre ultimo dia da maturação (dia zero) e o ultimo dia do Dry hopping analisado (dia 4).....	25
Figura 12: Foto de um vial de armazenagem com presença de lúpulo particulado.....	29
Figura 13: Comparativo último dia da maturação e último dia do DH (dia 10) produtor 1.....	32
Figura 14: Trecho 1 do cromatograma total.....	32
Figura 15: Trecho 2 do cromatograma total.....	32
Figura 16: Trecho 3 do cromatograma total.....	33
Figura 17: Comparativo entre o último dia da maturação e o último dia do DH (dia 10) produtor 2.....	35
Figura 18:Trecho 1 do cromatograma total.....	35
Figura 19: Trecho 2 do cromatograma total.....	36

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1: Composição do óleo dos lúpulos Columbus, Hallertau e Challenger. ....	11
Tabela 2: Terpenos de interesse e odores relacionados .....	15
Tabela 3: Terpenóides de Interesse e odores relacionados .....	15
Tabela 4: Tabela de compostos Identificados da figura 13.....	26

## LISTA DE SIGLAS

DH	Dry Hopping
IPA	Indian Pale Ale
APA	American Pale Ale
AAA	American Amber Ale
PDMS	Poli Dimetil Siloxano
DVB	Divinil Benzeno
GC	Cromatografia Gasosa
MS	Espectrometria de Massas
SPME	Microextração em fase Sólida
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LG	Cromatografia Líquida
FM	Fase Móvel
FE	Fase Estacionária
FID	Detector de Ionização de chama
TCD	Detector de Condutividade Térmica
AED	Detector por Emissão Atômica

## Lista de Gráficos

Gráfico 1: Crescimento do número de cervejarias de acordo com o MAPA.....	6
Gráfico 2: : Variação das áreas de Mirceno, Cariófileno e Humuleno a partir do dia 0 ao quarto dia de DH (IPA).....	27
Gráfico 3: Variação das áreas de Mirceno, Cariófileno e Humuleno observada nos testes preliminares (APA).....	28
Gráfico 4: Perfil de Variação APA produtor 1; Média das Áreas Relativas das replicatas. ....	34
Gráfico 5: Perfil de Variação APA produtor 2; Média das Áreas Relativas das replicatas ....	36

## S mario

1. Introdu�o.....	1
2. Objetivos .....	4
2.1. Objetivo Geral.....	4
2.2. Objetivos específicos.....	4
3. Referencial teórico.....	5
3.1. Uma Breve História da Cerveja .....	5
3.2. Mercado de cerveja no Brasil .....	5
3.3. Processo de produ�o .....	7
3.4. O Lúpulo.....	9
3.4.1. História.....	9
3.4.2. Cultivo e Estilos de Cerveja.....	9
3.4.3. Composi�o do óleo essencial do lúpulo e Aromas Associados.....	11
3.4.3.1. Hidrocarbonetos .....	13
3.4.3.2. Compostos Oxigenados .....	15
3.5. Dry hopping .....	16
3.6. Cromatografia a gás (GC).....	17
3.7. Microextra�o em Fase sólida (SPME).....	19
4. Metodologia.....	22
4.1. Amostras .....	22
4.2. Preparo amostral.....	23
4.3. Análise.....	23
4.4. Processamento de dados .....	24
5. Resultados e Discussão .....	25
5.1. Testes preliminares.....	25
5.1.1. Amostras <i>Indian Pale Ale</i> (IPA).....	25
5.1.2. Amostras <i>American Pale Ale</i> (APA) .....	28
5.2. Testes otimizados .....	30
5.2.1. <i>American Amber Ale</i> (AAA) Produtor 1.....	31
5.2.2. <i>American Pale Ale</i> (APA) Produtor 2.....	34
6. Conclusão .....	38
7. Bibliografia.....	39

## 1. Introdução

O mercado na área de cervejas artesanais no Brasil de acordo com o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e a ABRACERVA (Associação Brasileira de Micro Cervejarias), apresentou um crescimento substancial de 2010 para 2019. Micro cervejarias por produzirem em baixa escala tem liberdade para modificar e/ou acrescentar o procedimento básico de síntese da bebida com fim de adicionar aromas diferenciados, diferentes graus de amargor e possuir um alto grau de qualidade no produto final. Os ingredientes para a produção são importados, acarretando o aumento do preço final da cerveja devido a tributação imposta. Além das altas taxas de tributação, a quantidade de insumo utilizado é muito maior e mais específicas, do que uma grande cervejaria utiliza normalmente, dado os diferentes graus de produção.

Os tipos de cervejas podem ser divididos em “comuns” e especiais. As “comuns” geralmente são do tipo l ager, apesar de tamb em existirem as l agers especiais, são leves, possuem pouca ênfase no aroma, baixa fermenta o, nível alcoólico baixo e são consumidas geralmente a temperaturas reduzidas. Enquanto que as especiais utilizam o processo de produ o básico somado a etapas adicionais para refino das características da cerveja e principalmente do aroma. Pertencentes a esta sec o pode citar as cervejas tipo ale como as Pale Ales, Brown Ales e Mild Ales.

A cerveja   produzida, basicamente, a partir de água, malte, lúpulo e leveduras, embora cereais não maltados e condimentos possam fazer parte da constitui o de diversas cervejas, inclusive de cervejas consideradas artesanais ou especiais. O processo básico consiste de diversas etapas, sendo as principais a brasagem, fervura, fermenta o e matura o. A brasagem consiste em transformar a cares não fermentáveis, originários do malte mo do, em a cares fermentáveis por meio de enzimas digestivas. A fervura   quando o lúpulo   adicionado, concedendo o amargor da cerveja e liberando compostos voláteis que contribuem para a composi o do aroma da bebida além de promover a evapora o de voláteis indesejados no produto final. A fermenta o utiliza as leveduras para consumir os a cares, presentes no mosto, que foram produzidos na brassagem e convertê-los em álcool e gás carb nico. Por fim a matura o tem por objetivo a estabiliza o de moléculas instáveis presentes no liquido, assim como a consolida o das características da cerveja como o aroma, o grau alcoólico e seu sabor.

O lúpulo como visto anteriormente é uma peça fundamental na determinação do tipo de aromas e sabores que se tem por objetivo produzir. Tal ingrediente é composto basicamente por alfa ácidos, que passarão por uma isomerização e se convertem em iso alfa ácidos dando amargor, e óleos essenciais responsáveis pelo aroma, caso sejam retidos com sucesso no mosto. A questão de os óleos serem retidos ou não no mosto depende do momento da fervura na qual o lúpulo é inserido. Normalmente o lúpulo é inserido nos 10 minutos finais da fervura, resultando em uma maior retenção de compostos voláteis, assim aroma mais acentuado, e menor liberação de alfa ácido.

Caso o produtor queira acentuar o aroma de lúpulo na cerveja, utiliza-se o processo de dry hopping (DH). Tal técnica consiste em adicionar lúpulo à cerveja após a fermentação e a baixas temperaturas, assegurando quase total aproveitamento dos aromáticos presentes na planta na composição do aroma. Ademais o tempo de contato, do lúpulo com o mosto, é uma variável que interfere diretamente na intensidade do aroma. Apesar da maioria dos produtores utilizarem períodos de exposição particulares a sua produção, a maior parte dos cervejeiros concorda que de 3 a 14 dias é o suficiente para um aroma encorpado e característico. Ainda assim não há uma precisão na identificação, ou mesmo concordância, dos compostos voláteis presentes em diferentes mostos dado um período de contato semelhante.

Um método viável na avaliação de compostos voláteis em química analítica é a utilização de microextração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS). Os fatores que corroboram para o uso de tal técnica de extração, para compostos voláteis, se dão por não empregar solventes, alto poder de pré-concentração dos analitos, quando utilizada em conjunto com métodos de extração específicos, além do fácil transporte do material extraído para o cromatógrafo. Já para a técnica de análise, os destaques são a elevada capacidade de seleção de analitos por detectar uma imensa gama de compostos orgânicos, poder de separação de diversos compostos orgânicos voláteis e reprodutibilidade com resultados confiáveis e precisos.

Portanto, uma alternativa para a melhoria da qualidade da cerveja pelo uso da química analítica é a utilização do SPME e GC/MS, para melhor compreensão dos efeitos do dry hopping sobre a proporção de compostos voláteis, dado diferentes períodos de contato do lúpulo com o mosto, responsáveis pelo aroma da cerveja.



## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

Avaliar a modificação na composição do aroma em função do tempo de exposição do lúpulo durante o processo de dry hopping.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar a estabilidade da amostra e modificações na fração volátil da cerveja até o momento de análise;
- Identificar compostos presentes no aroma da cerveja e nos lúpulos usados no dry hopping de cada cerveja analisada;
- Determinar o período ótimo de dry Hopping em função da quantidade de voláteis possivelmente extraídos pelo processo.

### **3. Referencial teórico**

A Cerveja é definida como uma bebida alcoólica, cuja origem do etanol é a fermentação de cereais, como a cevada, em um meio aquoso e a flavorização do produto é derivada de Lúpulos. (BOULTON, 2013)

#### **3.1. Uma Breve História da Cerveja**

O que temos como cerveja hoje em dia foi uma descoberta realizada na área da suméria há 3900 anos, por meio da observação de duas características dos cereais. A primeira característica é o gosto adocicado sentido ao consumir grãos umidificados, devido ao baixo grau de vedação que as estruturas de armazenamento apresentavam. Enquanto a segunda era a “misteriosa” mudança de propriedades apresentada pelo mingau, derivado de gramíneas, o qual após certo tempo exposto ao ar livre apresentava efervescência e a capacidade de embriagar o consumidor. Esses processos são explicados em épocas mais recentes como a liberação de enzimas conversoras de amido em açúcar e a conversão de açúcar em álcool por leveduras selvagens existentes no ar que permeava o alimento citado, respectivamente (STANDAGE, 2005). Além da cevada e da levedura outro ingrediente utilizado na produção da cerveja atual é o lúpulo, contudo o início da sua utilização só é visto após milhares de anos na idade média.

Desde 3900, passando pela idade média e chegando na atualidade é importante notar que a cerveja se tornou uma bebida apreciada mundialmente, de valor cultural e importância econômica notáveis. Tendo isso em vista, sua apreciação em solo brasileiro foi um costume trazido junto a comerciantes, vindos devido a colonização europeia. A produção de cerveja nacional não tem um início preciso, porém há registros de vendas de cervejas nacionais datados de 27 de outubro de 1836, sendo este o dado mais próximo de um início registrado (HILLESHEIM; MIGNONI, 2018). Em 1888 com a fundação da “Manufatura de Cerveja Brahma Villigier e Cia” no Rio de Janeiro, a primeira indústria cervejeira nacional, o mercado de cervejas brasileiras ganha maior expressão.

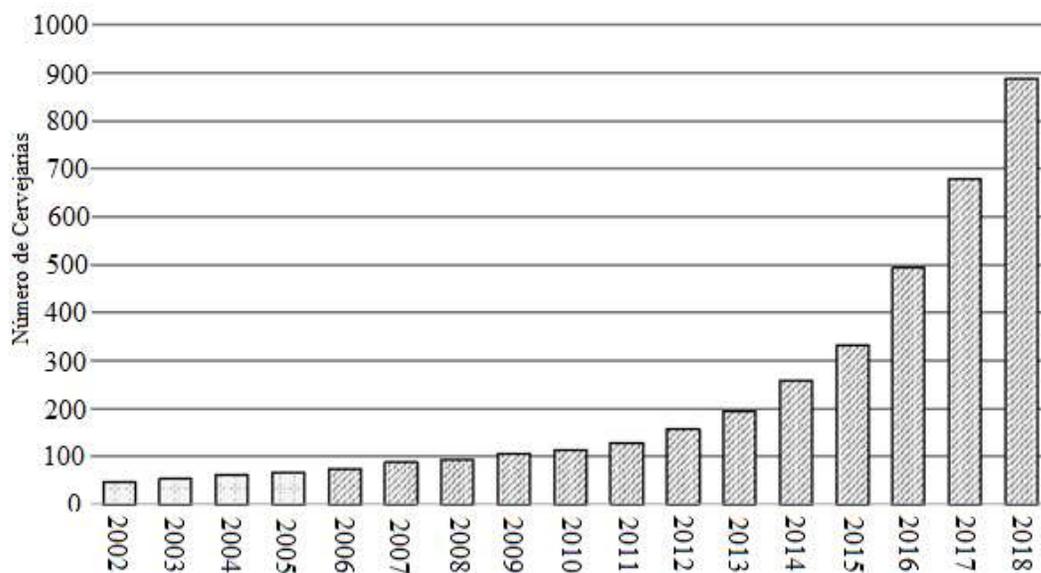
#### **3.2. Mercado de cerveja no Brasil**

O brasileiro consome cervejas de marcas como Skol, Brahma, Kaiser e afins, consideradas cervejas de massa dado o seu preço de compra e facilidade de acesso. Contudo a preferência do consumidor tem sido refinada ao longo dos últimos anos como pode ser visto a partir de 2010 com o aumento na procura por cervejas de

produção artesanal que naturalmente apresentam características mais singulares de apresentação e degustação.

Dados coletados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pela Associação brasileira de cerveja artesanal (ABRACERVA) corroboram com a ideia já apresentada. Como exemplo, no ano de 2018 houve o registro de 6800 produtos relacionados à cerveja e chope. Somado a isso, ocorreu a criação de 210 novas fábricas de cerveja no país, totalizando 889 cervejarias. Adicionalmente, o Gráfico 1 mostra o crescimento do número de cervejarias entre 2002 e 2018. É válido apontar também a mudança efetuada pela Instrução Normativa n°s 72 de 16 de novembro de 2018 onde a concessão do registro de novos produtos foi facilitada por ser concedida automaticamente ao produtor que declare ser responsável por auto regular a adequação do seu produto as leis de regulamentação vigentes (MARCUSO; MÜLLER, 2018)

Gráfico 1: Crescimento do número de cervejarias de acordo com o MAPA

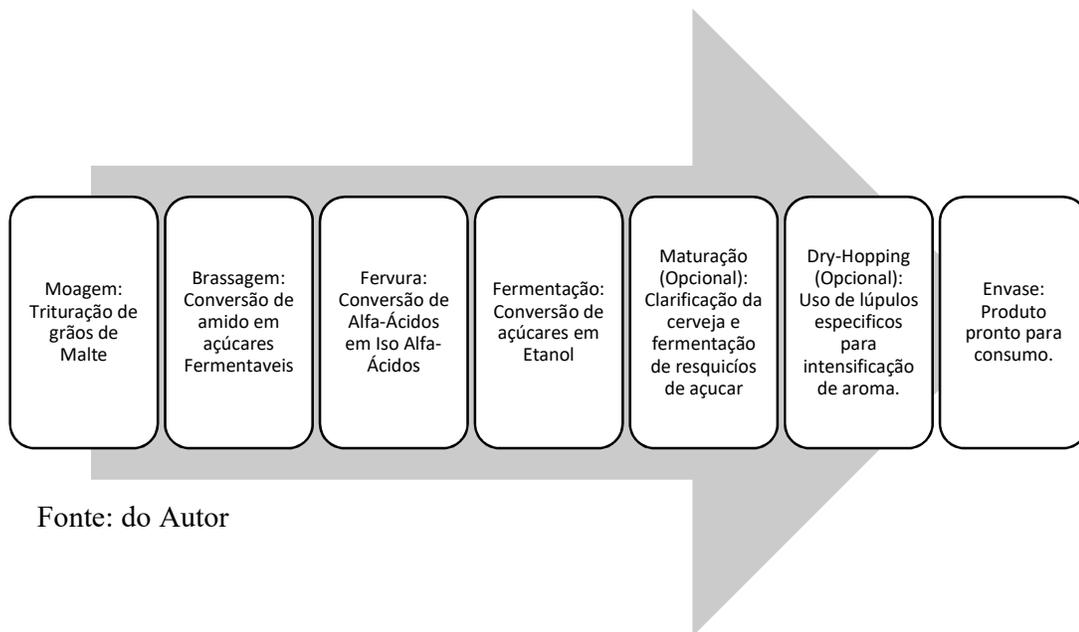


Fonte: Anuário de cerveja de 2018 do MAPA

### 3.3. Processo de produção

A produção de uma cerveja de qualidade gira em torno de uma conjunção de fatores. Dois deles são a tradição contida na longevidade da existência do processo e crescente aprofundamento científico na interpretação química de ocorrências macro e microscópicas das etapas de produção.

Figura 1: Etapas do processo de produção de cervejas



Fonte: do Autor

O processo de produção de cervejas em um âmbito geral consiste de passos apontados na Figura 1. A moagem implica na trituração do malte a fim de expor o endosperma, reserva energética, do grão onde está localizado o amido a ser fragmentado nos açúcares fermentáveis utilizados na fermentação. Além da exposição do amido a casca do malte moído servirá como um filtro natural de impurezas, dado que não tenha sido extensivamente triturado. A etapa seguinte é a brassagem, onde efetivamente ocorre a fragmentação do amido, obtido previamente, em açúcares fermentáveis, principalmente a maltose e a maltriose, pela ação enzimática da beta e alfa amilase nativas do grão, conservadas pela maltagem da cevada (PALMER, 2006).

A fervura é a etapa seguinte onde são utilizados lúpulos para a atribuição do amargor ao produto por meio da conversão de alfa ácidos em iso alfa ácidos. Além de

ocorrer a reação descrita, o mosto também é esterilizado de atividades microbiológicas indesejadas e ocorre a eliminação de compostos voláteis indesejados. Contudo retirada de voláteis é não seletiva, causando um impacto negativo no aroma da cerveja, por retirar os compostos de interesse inerentes ao óleo essencial do lúpulo cuja existência constrói o aroma da bebida. Há dois tipos de lúpulos utilizados nesse processo o lúpulo de amargor, rico em alfa ácidos, e o lúpulo de aroma, com baixo teor de alfa ácidos e alto teor de óleos essenciais voláteis. O lúpulo de amargor é inserido no início da fervura para converter a maior quantidade de alfa ácidos possível, concedendo um amargor intenso a cerveja. Por outro lado, o lúpulo de aroma é inserido no tanque durante os minutos finais do processo, visando a fixação de substâncias relacionadas ao aroma, minimizando perdas pelo baixo tempo de exposição a alta temperatura.

A fermentação é onde ocorre a atribuição de uma características essencial da bebida, o grau alcoólico. O etanol é obtido por meio da conversão da maltose em etanol e dióxido de carbono. O procedimento de conversão descrito também tem um impacto negativo no aroma da bebida, visto que o dióxido de carbono produzido retira os voláteis associados ao lúpulo e responsáveis pelo aroma. Por outro lado, as leveduras que fermentam o mosto também geram compostos importantes para o aroma da cerveja. Um aspecto interessante de se apontar sobre o processo total de produção é a possibilidade do uso de uma etapa adicional para intensificar o aroma da cerveja.

As etapas previamente descritas são obrigatórias na produção da cerveja, ou seja, para o produto almejado ter as características inerentes a bebida ele necessariamente precisa passar pelas etapas explicitadas. No entanto, há etapas adicionais e opcionais, como a maturação, onde a cerveja é posta em repouso para que ocorra o clareamento da mesma, conversão de resquícios de açúcar em etanol e conversão de diacetil em acetoína e butano-2,3-diol. (BAMFORTH et al., 2011). Ademais existe o dry hopping (DH) cujo propósito reside na inserção e/ou potencialização do aroma de lúpulo da cerveja por meio da utilização do lúpulo em temperaturas destinadas a fixação de seus voláteis, afim de aumentar o aroma da cerveja.

### **3.4. O Lúpulo**

#### **3.4.1. História**

O cultivo de lúpulo não tem nenhum registro específico indicando o local onde tenha sido praticado pela primeira vez. No entanto a sua utilização como material de fabricação de cerveja se dá onde atualmente temos a Alemanha, sem uma data específica. A partir desse ponto o uso da planta começou a se disseminar pela Europa e registros começaram a serem feitos descrevendo o cultivo e aplicação, como por volta de 1328 com a certificação da posse de um campo de lúpulo pelo Conde Gunther de Ravenburg. Avançando no tempo em 1835 William Chadwick publica “A practical Treatise on Brewing” onde sugere a reserva do lúpulo utilizado na fermentação para inserção nos cascos de maturação afim de acentuar o aroma da bebida. Além disso ele ressalva a grande diferença entre o aroma emanado ao final da fermentação e o produzido pela inserção de lúpulos no casco da cerveja em maturação (BOULTON, 2013; GROSS, 1900; HIERONYMUS, 2012).

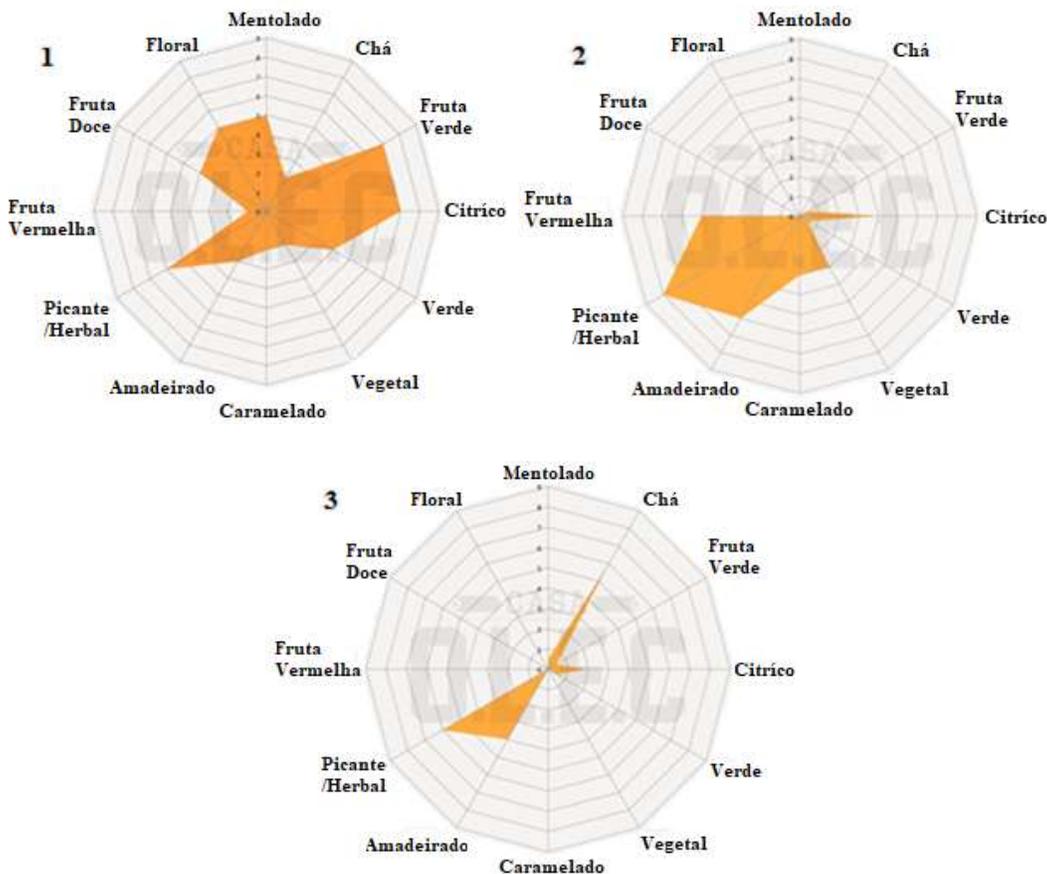
#### **3.4.2. Cultivo e Estilos de Cerveja**

A escolha de um cultivo específico de lúpulo é de extrema importância para a determinação das características de amargor e aroma desejados no produto final. Sabendo disso, o nome dado ao lúpulo é referente ao seu respectivo local de produção original e tal denominação será o seu cultivo (BIENDL et al., 2014). Como por exemplo o lúpulo Hallertau tendo seu nome derivado de uma região da baviara alemã, o seu local de origem. Contudo o Hallertau é somente um de vários lúpulos existentes cada qual com especificidades de aroma e amargor obtidos por suas condições de crescimento.

Estilos de cerveja são comumente definidos quando um grupo de produtores criam uma variedade nova de cerveja, seja com novos lúpulos ou uma mistura de diferentes cultivos. Os parâmetros mais recorrentes na confecção de um novo estilo giram em torno de fatores geográficos e políticos que servem para confirmar a criação de um estilo. No entanto o aspecto químico de cervejas distintas também é um fator determinante para a sua diferenciação, dada a diversidade de aromas possíveis de serem obtidos em função da composição do lúpulo utilizado (BARTH, 2013).

Diferentes estilos de cerveja utilizam diferentes cultivos de lúpulo em sua produção, logo eles possuem diferentes perfis de aroma. Por exemplo, cervejas do estilo *American Pale Ale* geralmente utilizam lúpulos de origem americana, com sensações olfativas herbais, enquanto as *Pale Bitter* utilizam lúpulos de origem alemã. A Figura 2 apresenta os perfis de três lúpulos, eles sendo o Columbus (Estados Unidos), Hallertau Mittelfruh (Alemanha) e Challenger (Reino Unido).

Figura 2: Perfis dos Lúpulos Columbus, Hallertau Mittelfruh e Challenger e tabela com indicadores de características



Legenda: Os lúpulos e suas principais sensações olfativas: (1) Columbus; picante/herbal, cítrico e fruta verde; (2) Hallertau Mittlefruh; picante/herbal, fruta vermelha e amadeirado (3) Challenger; chá e picante/herbal .

Fonte: Distribuidora de insumos Casa O.L.E.C

Os perfis apresentados tem sua origem na análise olfatométrica do lúpulo relacionando tendo em vista que cada descrição de aroma tem um conjunto de

correspondentes químicos presentes na composição do óleo essencial da planta. Associado aos gráficos anteriores está a Tabela 1 onde está constatada a composição majoritária, em porcentagem, do óleo essencial de acordo com análises realizadas pela própria distribuidora.

O conjunto de compostos apresentados na Tabela 1 e a sensação olfativa construída pela suas presenças são devidas aos metabólitos secundários da planta do lúpulo, constituídos majoritariamente de terpenos e sesquiterpenos responsáveis por aromatizar cervejas. Tendo em vista a complexidade da sensação olfativa do lúpulo o delineamento da sua composição química é necessário para melhor compreensão de suas possíveis utilizações. Nesse aspecto a cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) é um caminho válido em estudos relacionados (FENG, 2014).

Tabela 1: Composição do óleo dos lúpulos Columbus, Hallertau e Challenger.

Descrição	Componentes de Aroma		
	Columbus	Hallertau Mittelfruh	Challenger
Óleo total	2,5 - 3,5 mL	0,7 - 1,3 mL	1,0 - 1,7 mL
Mirceno	50 - 60 %	20 - 28 %	28 - 32 %
Humuleno	12 - 18 %	45 - 55 %	25 - 32 %
Cariofileno	9 - 11 %	10 - 15 %	8 - 10 %
Farneseno	< 1 %	< 1 %	1 - 3 %
Linalol	-	0.7 - 1.1 %	-

Fonte: Distribuidora de insumos Casa O.L.E.C

### 3.4.3. Composição do óleo essencial do lúpulo e Aromas Associados

A importância da planta lúpulo para a produção de cerveja reside na utilização de seus metabólitos secundários na produção, tais metabólitos são separados em polifenóis, resinas e o óleo essencial. Os mais importantes são a resina, composta de alfa e beta ácidos importantes no amargor da bebida, e o óleo constituído principalmente de terpenos (STEENACKERS; DE COOMAN; DE VOS, 2015).

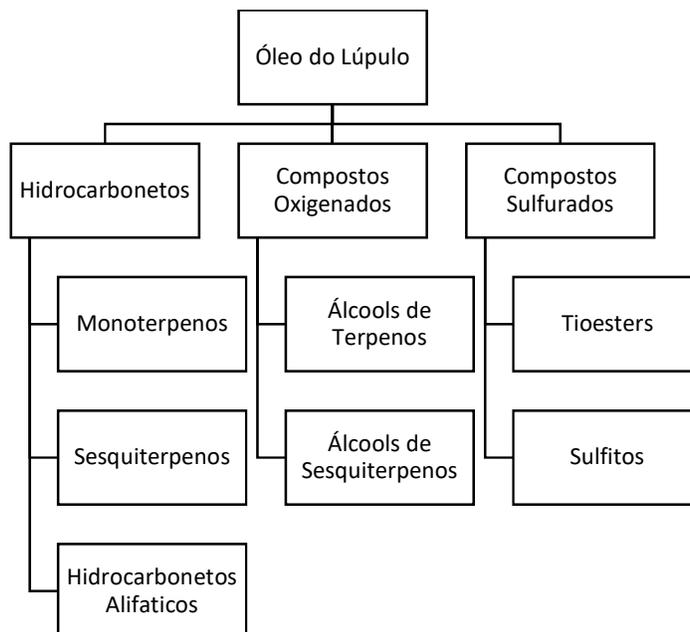
O óleo de qualquer lúpulo pode apresentar compostos pertencentes a 3 classes, sendo elas hidrocarbonetos, compostos oxigenados e compostos sulfurados em diferentes combinações e proporções, como estruturado na Figura 3 (GRIZOTTO, 2017; SCHÖNBERGER; KOSTELECKY, 2011; SHARPE; LAWS, 1981). As classes

de hidrocarbonetos é subdividida em Monoterpenos, Sesquiterpenos e hidrocarbonetos alifáticos; a de compostos oxigenados são organizados em alcoóis de terpenos e sesquiterpenos e, por fim os compostos sulfurados contém os tioésteres e sulfitos.

O conjunto de compostos pertencentes as classes descritas contribuí de forma a construir as características de aroma possíveis de serem obtidas ao se usar lúpulo, sejam elas agradáveis (Hidrocarbonetos e Compostos oxigenados) ou indesejáveis (Compostos Sulfurados) (HIERONYMUS, 2012). Como exemplo, o lúpulo Cascade, amplamente utilizado pela sua capacidade de produzir cervejas com amargor e sensações olfativas estáveis, possui um aroma predominantemente cítrico e de frutas vermelhas, isso é consequência direta da proporção de monoterpenos e sesquiterpenos presente no óleo essencial extraído da planta (SHARP et al., 2017).

Importante mencionar que os hidrocarbonetos e compostos oxigenados são encontrados na fração de óleo essencial presente no óleo total de um lúpulo. Sendo que óleos essenciais são um mistura complexa de compostos voláteis produzidos por organismos vivos e sua separação do organismo de origem só é possível via métodos físicos, como destilação e prensagem do ser de origem. Além disso as classes de compostos comuns a todo óleo essencial são os sesquiterpenos, mono e diterpenos e os fenilpropenos, contudo o número de compostos individuais que podem ser encontrados são incintavéis (BASER et al., 2010).

Figura 3: Diagrama indicando Composição do Óleo do Lúpulo

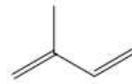


Fonte: SCHÖNBERGER; KOSTELECKY, 2011

### 3.4.3.1. Hidrocarbonetos

Esse conjunto de compostos se referem ao conjunto de compostos cuja classificação é dada a partir da quantidade de blocos de Isopreno ( $C_5$ ) (Figura 4) que os constroem, estes sendo os Terpenos. Para dois blocos de isopreno presentes na estrutura eles são chamados de Monoterpenos ( $C_{10}$ ), enquanto para três unidades de isopreno se tem os Sesquiterpenos ( $C_{15}$ ). Os terpenos de maior representatividade e ocorrência presentes no lúpulo são o Mirceno, Cariofileno, Humuleno e Farneseno suas respectivas estruturas se encontram na Figura 5 (SOLOMONS; FRYHLE, 2012). Dos terpenos, o Mirceno é um monoterpene, enquanto o  $\beta$ -Farneseno,  $\alpha$ -Humuleno e o  $\beta$ -Cariofileno são sesquiterpenos, cada um desses componentes apresentam características odorizantes distintas, como está registrado na Tabela 2, como o odor do Mirceno remete a gerânio e bálsamo (STEINHAUS; SCHIEBERLE, 2000), o Cariofileno remete a cravos e pinho (KISHIMOTO et al., 2005) e o humuleno a bálsamo (STEINHAUS; SCHIEBERLE, 2000).

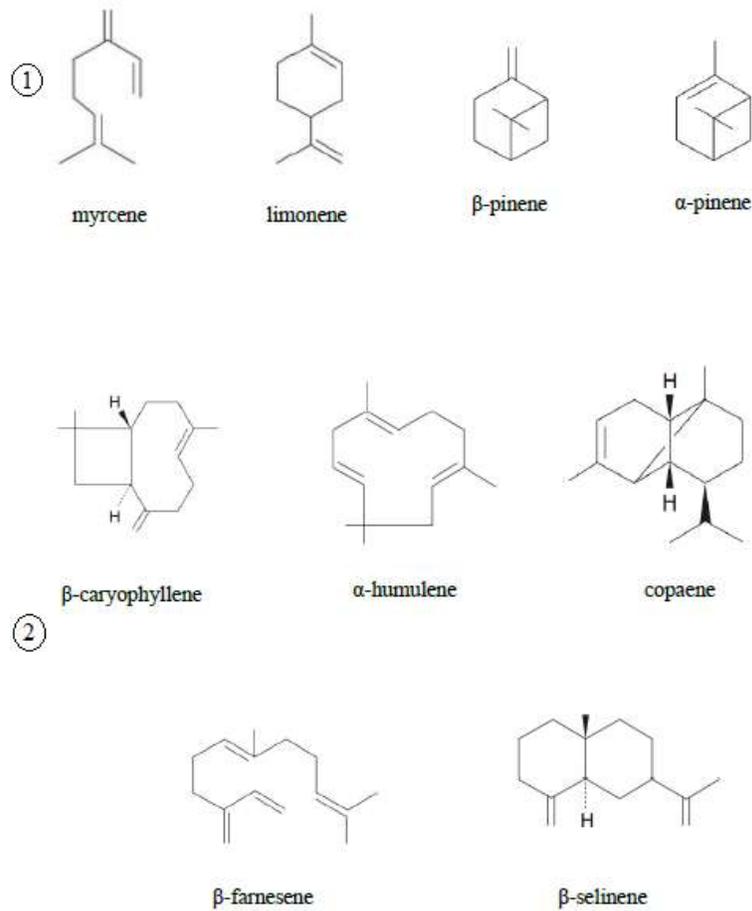
Figura 4: Estrutura do Isopreno



**2-Methyl-1,3-butadiene  
(isoprene)**

Fonte: SOLOMONS; FRYHLE, 2012

Figura 5: Estruturas de terpenos importantes presentes no óleo do lúpulo



Legenda: (1) Monoterpenos; (2) Sesquiterpenos

Fonte: FENG, 2014

Tabela 2: Terpenos de interesse e odores relacionados

<b>Composto</b>	<b>Característica de odor</b>
Mirceno	Resina, Herbacea, Bálsamo e Gerânio
Cariofileno	Cravos, Cedro e Pinho
Humuleno	Bálsamo

Fonte: EYRES; DUFOUR, 2008; STEINHAUS; SCHIEBERLE, 2000

O Farneseno não foi achado nenhum indicativo de que ele tenha impacto efetivo no aroma da cerveja, ainda mais levando em consideração a sua presença não universal em óleos essenciais do lúpulo.

#### 3.4.3.2. Compostos Oxigenados

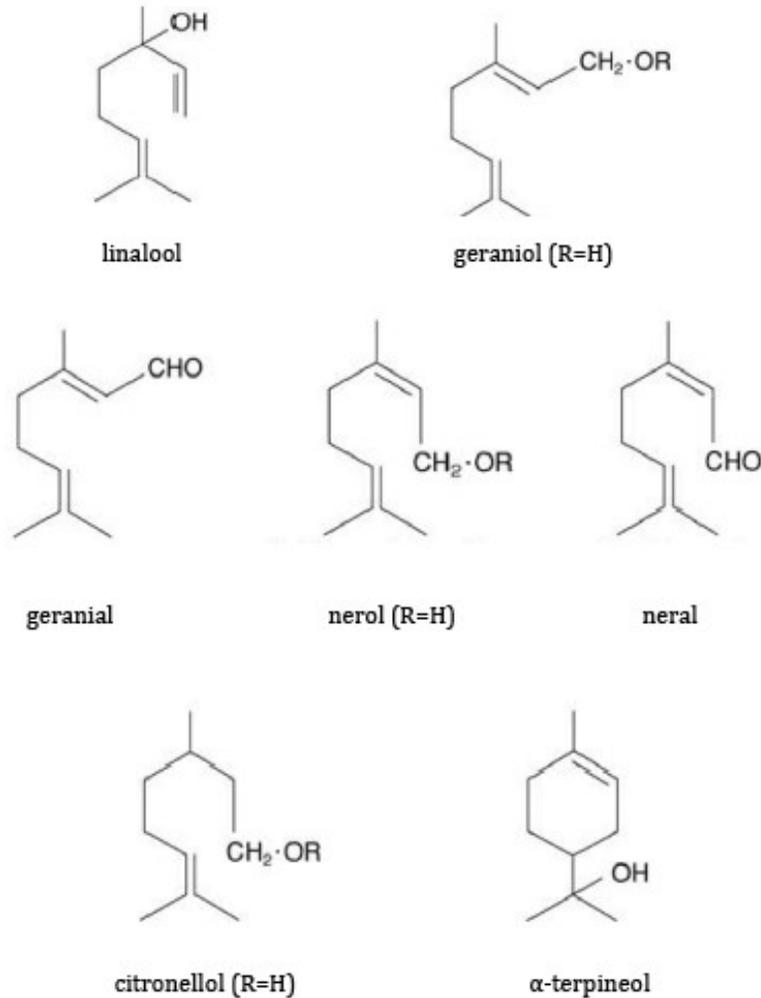
Esse grupo de compostos podem ser classificados como terpenóides, estruturas oxigenadas de terpenos, como os alcoóis Linalol, Geraniol e Nerol e os aldeídos Geranial e Neral, e não terpenóides que consistem em alcoóis aromáticos e alifáticos, aldeídos, estéres e cetonas com contribuições diversas no perfil do aroma (FENG, 2014; SHARPE; LAWS, 1981). Levando em consideração a contribuição de aroma e presença no óleo da planta, o Linalol e o Geraniol servem como fontes importantes de aromas florais cítrico e de coentro associados ao linalol, e gerânio e rosas ao geraniol, como indicado na Tabela 3 (EYRES et al., 2005).

Tabela 3: Terpenóides de Interesse e odores relacionados

<b>Composto</b>	<b>Característica de Odor</b>
Linalol	Floral, Cítrico
Geraniol	Floral, Rosáceo

Fonte: EYRES et al., 2005

Figura 6: Compostos Oxigenados presentes no Óleo essencial do lúpulo



Fonte: FENG, 2014

Os compostos sulfurados não serão aprofundados nesse trabalho, dado que sua presença na cerveja é associada a aromas não desejados na bebida, como o odores relacionados a queijo, cebola, alho e ovos podres estes sendo apenas exemplos de possíveis sensações olfativas associadas aos constituintes do grupo mencionado (BOULTON, 2013; SCHÖNBERGER; KOSTELECKY, 2011).

### 3.5. Dry hopping

Comparado com o método de late hopping cuja a inserção de lúpulo é feita nos minutos finais da fervura para atribuição de aroma a cerveja, o DH tem maior eficiência em reter tais voláteis. Tal eficiência é justificada pela etapa ser realizada com a cerveja

em seu período de descanso em temperatura ambiente (25°C), ou temperaturas menores, quando comparado aos 100° C da fervura. Por ser praticado a baixas temperaturas, o DH se faz mais eficaz na fixação de voláteis a cerveja. O que leva a expor a finalidade pela qual o DH é feito que é intensificar o aroma, sem a modificação do amargor, dessa forma atribuindo qualidade e singularidade ao produto. A etapa geralmente ocorre após a fermentação, durante o período de Maturação da cerveja onde as condições de temperatura são adequadas ao princípio do processo (BOULTON, 2013).

O tipo de lúpulo utilizado no DH é o lúpulo de aroma, dado que os compostos a serem fixados na bebida para atribuição de aroma são originários do óleo essencial da planta, independente da presença de alfa ácidos e não precisa necessariamente ser o mesmo utilizado durante a fervura. A quantidade de lúpulo utilizada no DH é, comparativamente, bem maior do utilizado na fervura para atribuição de amargor. Em proporções gerais, é utilizado 1 g de lúpulo por litro de cerveja enquanto que no DH varia de 2 a 8 g/L de cerveja. Um fator adicional ao DH é a necessidade do lúpulo estar em contato direto com a cerveja para efetuar a transferência dos compostos.

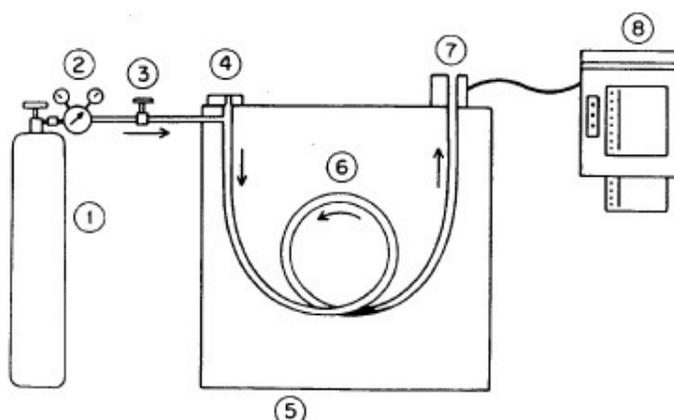
O tempo sob o qual uma cerveja é submetida ao DH é realizado não é um consenso entre os cervejeiros, já que não há uma relação clara entre o período de execução do processo com a intensidade do aroma ao final dele. Tanto que há DH com duração de 15 dias e outros de 3 a 4 dias onde ambas cervejas possuem aromas intensos e característicos do lúpulo utilizado. Portanto o estabelecimento de um tempo médio de 5 dias de DH é utilizado como referência e não como uma condição para a produção de uma cerveja de qualidade. Há uma pequena quantidade de trabalhos acadêmicos destinados a explicar ou ao menos expor alguma relação entre tempo de execução de DH, taxa de transferência de voláteis durante o DH e intensidade de aroma existente no produto final (FORSTER; GAHR, 2013).

### **3.6. Cromatografia a gás (GC)**

De acordo com a IUPAC a definição para cromatografia é ‘‘Método Físico de separação cujos componentes a serem separados serão distribuídos entre duas fases uma estacionária (fase estacionária) e outra que se move em uma direção definida (fase móvel)’’. A técnica em questão pode ser classificada de acordo com a fase móvel (FM) utilizada sendo elas gás, cromatografia gasosa (GC), e líquida, para cromatografia líquida (LC). Em relação a fase estacionária (FE) esta é a denominação dada ao

composto utilizado como revestimento da coluna cromatográfica. Tal composto deve obedecer certas condições afim de desempenhar a função de FE estas sendo baixa pressão de vapor, ser termicamente estável e ter alta viscosidade. Os parâmetro indicados anteriormente são condições obrigatórias a todas as fases estacionárias, contudo a utilização de diferentes revestimentos para diferentes análises se dá pela melhor adequação da FE aos analitos a serem inseridos na coluna. A interação dos analitos com a FE em determinadas temperaturas somada as diferentes pressões de vapor relativas entre cada componente da amostra constitui o princípio de separação do método e caracteriza o processo de eluição (MC NAIR; MILLER, 1997).

Figura 7: Estrutura Básica de um Cromatógrafo a gás



Legenda: (1) Cilindro de gás; (2) Regulador do cilindro; (3) Válvula de controle de fluxo; (4) Injetor; (5) Forno; (6) Coluna Cromatográfica; (7) Detector; (8) Sistema de informação;

Fonte: MC NAIR; MILLER, 1997

O cromatógrafo, apesar de ser um instrumento de separação eficaz, ainda necessita de um detector, para caracterizar os compostos separados por meio de informações visíveis, possibilitando a identificação e quantificação dos compostos presentes na amostra analisada. Pedindo assim o acoplamento de técnicas capazes de desempenhar as funções previamente citadas, tais instrumentos tem por denominação detectores. Um exemplo de detector é o espectrômetro de massas (MS), ao associar um cromatógrafo a gás (GC) ao método de detecção mencionado temos um sistema funcional para utilização (GC-MS). Nesse âmbito é possível realizar a identificação estrutural dos compostos separados pelo cromatógrafo, dando acesso a informações mais precisas

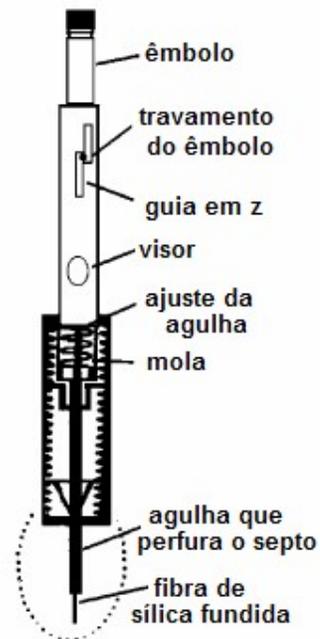
sobre a natureza das amostras a serem trabalhadas e possibilitando um melhor planejamento experimental. Além do MS é possível acoplar um vasto número de técnicas de detecção ao GC como Detector de ionização de chama (FID), detector de condutividade térmica (TCD), detector por emissão atômica (AED) sendo algumas possibilidades. A utilização desse método se dá por algumas razões como a alta capacidade de separação de compostos voláteis, flexibilidade no uso de diferentes detectores (no caso do GC) e a possibilidade de identificar estruturalmente os compostos separados, para a utilização de um detector MS (BERGER et al., 2014).

### 3.7. Microextração em Fase sólida (SPME)

O método de cromatografia a gás é restritivo no âmbito de amostras possíveis de serem analisadas em seu estado original, logo necessita de métodos de preparo de amostra para viabilizar uma análise cromatográfica. A Microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica de pré-concentração e extração de compostos voláteis por meio da sorção de analitos em um recobrimento externo de um suporte de fibra ótica com características semelhantes aos compostos a serem extraídos. A Figura 8 expõe a construção de um amostrador de SPME (LORD; PAWLISZYN, 2000), enquanto a Figura 9 detalha a construção da fibra em si, como dimensões suporte do recobrimento e suas dimensões.

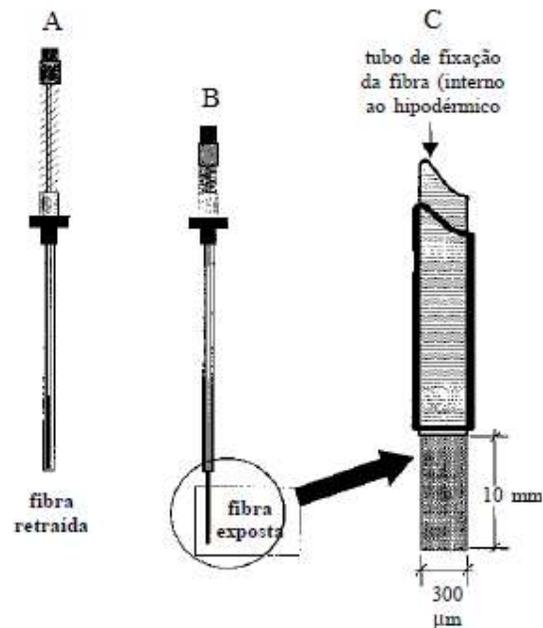
A técnica consiste na transferência de massa de analito da matriz para o recobrimento do suporte, por meio da exposição da fibra ao meio em que a amostra a ser extraída e/ou pré concentrada reside. A exposição da fibra a matriz pode ocorrer de duas formas por imersão direta, onde a fibra é inserida diretamente na matriz aquosa da solução, ou em *headspace* onde a fibra é exposta e mantida em suspensão acima da solução a ser extraída, ainda que dentro do vial onde reside a amostra. Passado o período de extração a fibra é retraída para a parte interna da seringa a qual está ligada para ser dessorvida no injetor do cromatógrafo onde a análise ocorrerá como exemplificado pela Figura 10 (PIRES VALENTE; AUGUSTO, 2000)

Figura 8: Estrutura de um amostrador utilizado em SPME



Fonte: NOGUEIRA, 2007

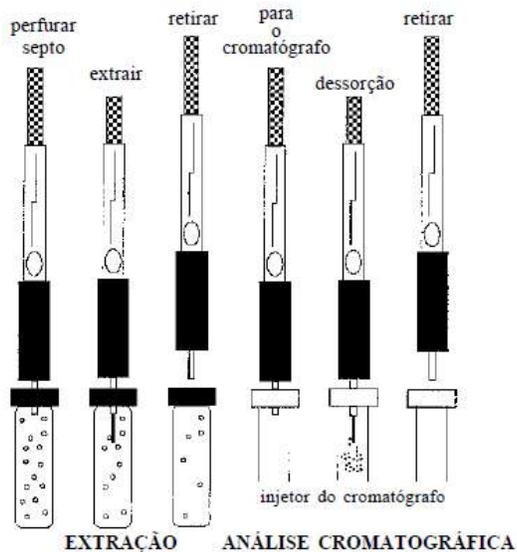
Figura 9: Estrutura Fibra SPME



Legenda: (A) Dispositivo com a fibra retraída; (B) Dispositivo com a fibra exposta; (C) Detalhamento de dimensões da fibra exposta com 10 mm de comprimento e 300 micrometros de largura.

Fonte: PIRES VALENTE; AUGUSTO, 2000

Figura 10: Descrição do Procedimento de extração SPME



Fonte: PIRES VALENTE; AUGUSTO, 2000

Por ser destinada a análises de matrizes voláteis sua utilização é vista de forma recorrente em diversas áreas de estudo como análises ambientais relacionadas à composição de solo, contaminações em corpos de água, composição de alimentos e determinação de compostos associados a parâmetros de consumo (PIRES VALENTE; AUGUSTO, 2000). Tal recorrência é observada por ser possível preparar amostras com baixa concentração de analitos e manipular o transporte de massa matriz/fibra por meio da variação da temperatura do local de extração. Além disso a modificação e criação de diferentes recobrimentos de extratores atribuíram uma enorme flexibilidade ao método, considerando que pode se criar fibras para fins extremamente específicos (BOJKO et al., 2012; LORD; PAWLISZYN, 2000).

## 4. Metodologia

### 4.1. Amostras

- Testes Iniciais

As 12 amostras utilizadas neste teste foram cervejas do estilo *American Pale Ale* e *Indian Pale Ale*, respectivamente APA e IPA, originárias da cervejaria Jóia mesquita. Especificamente foram 5 ml coletados diretamente do tanque de maturação, sem adição de lúpulo relativo ao DH, e 4 amostras de mesmo volume dos primeiros 4 dias de DH já com a presença do lúpulo totalizando 5 amostras do tipo IPA. Somadas à 7 amostras do tipo APA coletadas durante os 20 dias de DH A amostragem realizada foram as coletas de 5 ml de cerveja diretamente do tanque de maturação para a primeira amostra, sem adição de lúpulo para DH, do primeiro ao quarto dia de DH e o sétimo, nono e vigésimo dia do procedimento. No decorrer do DH houve dias em que foi utilizado dióxido de carbono para recircular os lúpulos pelo tanque, no entanto o produtor não registrou em quais dias especificamente ele executou tal ação.

- Testes Otimizados

As 22 amostras foram obtidas com produtores caseiros locais de cerveja artesanal, sendo 11 amostras de cada produtor. O conjunto 1 de amostras é do tipo *American Amber Ale*, enquanto o conjunto 2 é do tipo *American Pale Ale*. A coleta se refere ao último dia de maturação de cada produção (tempo zero) e os 10 dias de DH aos quais foram submetidas com adição de lúpulo no primeiro dia do procedimento. As quantidades e os tipos de lúpulos utilizados respectivamente foram 100 g de El Dorado para o Produtor 1 e 100 g de Columbus para o Produtor 2 . A coleta de 2 ml de amostra foi realizada diretamente do tanque onde os processos ocorreram. Estas amostras ficaram 1 mês armazenadas em uma geladeira de uso comercial a 5°C antes de serem extraídas e injetadas.

## 4.2. Preparo amostral

- Testes Iniciais

O volume coletado e a forma com a qual a matriz foi retirada do tanque de produção são de 5 ml de cerveja retirados diretamente da bebida em DH e armazenados em vials de vidro de 15 mL com septos de silicone. Uma alíquota de 1 mL de cerveja foi retirada do vial de armazenagem com uma micropipeta de 1000  $\mu$ L e o volume foi transferido para um vial de 40 mL específico para a extração por SPME em *headspace* da amostra.

- Testes Otimizados

Para os testes otimizados foi necessário a adição de 360 mg de NaCl e de 100  $\mu$ L de uma solução 0,0002% (v/v) de 1-Octanol (como padrão interno) ao vial de 40 mL destinado a extração por SPME em *headspace*.

## 4.3. Análise

- Testes Iniciais

As 12 amostras foram extraídas em duplicata. A extração foi realizada com um fibra tripla de PDMS/DVB/Carboxen a uma temperatura de 50°C por 20 minutos. A dessorção dos voláteis retidos na fibra ocorreu em um sistema GC/MS Shimadzu QP-2010 Plus equipado com sistema CombiPal para injeções automáticas de SPME. A fibra foi dessorvida no injetor em splitless a 250°C por 1 minuto para a coluna com a seguinte programação de temperatura: temperatura inicial 40°C, 40-160°C, 3°C/min; 160-260°C 20°C/min; 2 minutos a 260°C, com um fluxo de gás Hélio de 1mL/min. O espectrômetro de massas foi configurado para realizar o monitoramento no modo scan na faixa de 40 e 350 m/z e 1,4 minutos de corte de solvente, sob uma temperatura de interface de 240°C e a temperatura da fonte de íons em 200°C. A sensibilidade do detector foi calibrada automaticamente de acordo com o tuning do equipamento.

- Testes Otimizados

As 22 amostras foram analisadas em duplicata. A extração foi realizada com uma fibra tripla de PDMS/DVB/Carboxen a uma temperatura de 60° C por 40 minutos sob agitação constante. A dessorção dos voláteis residentes na fibra ao fim da extração ocorreu em um sistema GC/MS Shimadzu QP-2010 Plus equipado com sistema

CombiPal para injeções automáticas de SPME. A fibra foi dessorvida no injetor em splitless a 250° C por 1 minuto com a seguinte programação de temperatura: temperatura inicial 40°C, 40-160°C, 3°C/min; 160-260°C, 20°C/min; 2 minutos a 260°C, com um fluxo de gás Hélio de 1mL/min. O espectrômetro de massas foi configurado para realizar o monitoramento de compostos em modo scan na faixa de 40 e 350 m/z e 3 minutos de corte de solvente, sob uma temperatura de interface de 240°C e a temperatura da fonte de íons em 200°C. Sensibilidade foi ajustada manualmente para 0,92 kV.

#### **4.4. Processamento de dados**

- Teste Inicial

O processamento consistiu na identificação dos compostos presentes na amostra por meio do cálculo de seus respectivos índices de retenção com o auxílio de um padrão de alcanos C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> e os respectivos tempos de retenção de cada pico a ser identificado. O cromatograma escolhido para servir como base da identificação foi produzido pela análise da amostra do quarto dia de DH. Com a identificação realizada, Mirceno, Cariofileno e Humuleno foram selecionados como compostos de interesse. Dessa forma, a área de cada um desses picos em cada cromatograma produzido foram registradas e um perfil de variação foi construído em função delas.

- Teste otimizado

O processamento dos cromatogramas resultantes compreendeu na identificação dos monoterpenos e sesquiterpenos alvos deste trabalho, sendo eles Mirceno, Cariofileno, Linalol, Geraniol e Humuleno. Um perfil de variação dos compostos foi confeccionado por meio de suas áreas relativas ao 1-Octanol, padrão interno utilizado, assim como a % do desvio padrão de cada par amostral trabalhado.

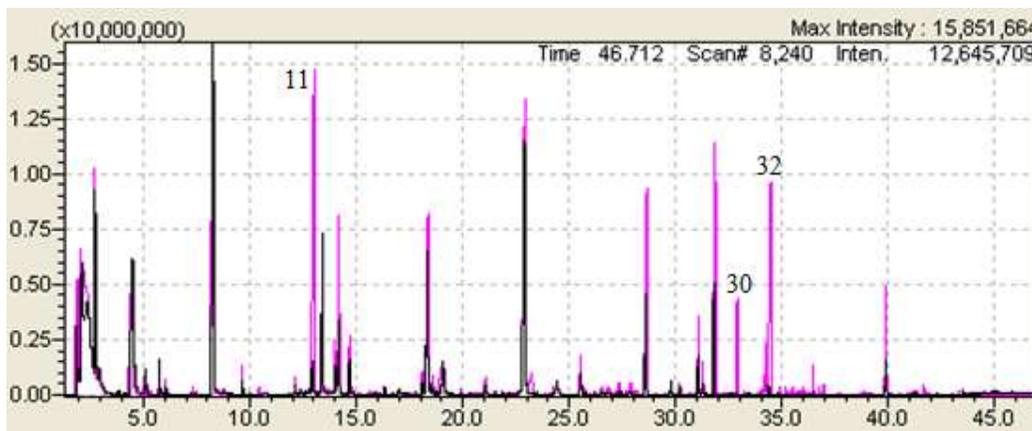
## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Testes preliminares

#### 5.1.1. Amostras *Indian Pale Ale* (IPA)

Tendo em vista que a extração do lúpulo é contínua durante o procedimento de DH é esperado um aumento contínuo da presença de compostos cuja presença varia de acordo com a progressão da etapa de produção analisada. Dessa forma a identificação dos compostos foi o primeiro passo a fim de determinar aqueles originários do lúpulo, os quais deveriam apresentar variação ao longo do DH. Determinados os compostos, construiu-se um perfil de variação para os compostos escolhidos e foi feita uma avaliação para verificar se o padrão construído se repetiria em uma matriz de características químicas similares. O cromatograma escolhido para a identificação da amostra foi pertinente a composição da bebida durante o quarto dia de DH de uma cerveja IPA, por ter apresentado picos de maior intensidade quando comparado com os demais dias analisados. A Figura 11 expõe o cromatograma utilizado para a identificação dos compostos presentes na bebida no quarto dia de DH e uma indicação numérica com os picos identificados, enquanto na Tabela 4 estão descritos os compostos identificados associados a cada pico indicado na Figura 11

Figura 11: Cromatograma comparativo entre ultimo dia da maturação (dia zero) e o ultimo dia do DH analisado (dia 4)



Legenda: : Cromatogramas: (Preto) Ultimo dia da maturação; (Rosa) Quarto dia do DH. Picos: (11) Mirceno; (30)Cariofileno; (32) Humuleno

Fonte: Do Autor

Tabela 4: Tabela de compostos Identificados da figura 13.

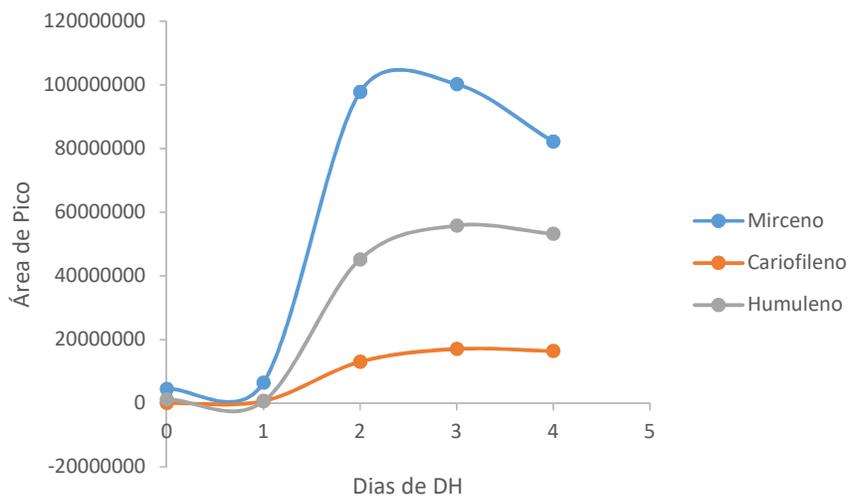
Picos	Composto	Tempo de Retenção (min)	IR.		Match	Match Reverso
			Experimental	Teórico		
1	Acetato de etila	2,753	600	-	933	933
2	2-metil-1-propanol	2,939	614	-	935	935
3	Acetato de n-propila	3,886	696	712	948	960
4	1,1-Dietoxietano	4,128	700	727	949	950
5	3-metil-1-butanol	4,491	707	734	895	896
6	2-metil-1-butanol	4,53	707	739	895	896
7	Acetato de 2-metilpropila	5,085	717	767	947	948
8	Butanoato de etila	5,761	802	800	942	942
9	Acetato de 3-metil-1-butanol	8,286	877	877	926	926
10	2-metil propanoato de 2-Metilpropila	9,650	914	914	942	945
11	$\beta$ -Mirceno	12,939	989	991	912	912
12	Hexanoato de etila	13,417	1000	996	934	934
13	4-metileno-hexanoato de metila	14,677	1.026	-	832	833
14	5-metilexanoato de etila	16,327	1.061	-	918	918
15	Heptanoato de etila	18,07	1.098	1095	871	872
16	$\beta$ -Linalol	18,329	1.103	1.107	924	924
17	N-Amilisovalerato	18,593	1.108	-	933	955
18	Etanoato de heptila	18,769	1.112	1.111	931	931
19	Feniletanol	19,077	1.119	1.110	952	958
20	Octanoato de etila	22,916	1.199	1.195	918	918
21	$\beta$ -Citronelol	24,412	1.231	1.228	911	911
22	Geraniol	25,523	1.255	1.256	961	961
23	(Z) 4-Decenoato de etila	26,711	1.281	-	764	780
24	Nonanoato de etila	27,376	1.295	1.297	903	903
25	Geranato de metila	28,581	1.322	1323	923	924
26	Etanoato de 3,7-dimetil-6-octenol	29,780	1.350	1354	906	906
27	Acetato de Neril	30,181	1.359	1365	907	907
28	Acetato de Geranil	31,051	1.378	1383	838	889
29	Decanoato de etila	31,793	1.395	1394	939	939
30	Cariofileno	32,849	1.420	1413	868	868
31	$\beta$ -Farneseno	34,186	1.451	1443/1458	847	854
32	$\alpha$ -humuleno	34,356	1.455	1454	940	940
33	Dodecanoato de etila	39,856	1.591	1595	897	922

Fonte: Do Autor

Ao comparar o último dia da maturação e o último dia do DH é observado que há uma diferença clara entre as áreas dos compostos originários do lúpulo. Isso implica em duas certezas: uma é a de que os compostos de interesse estão sendo extraídos e outra é que há a modificação da fração volátil durante a execução do DH.

De todos os picos identificados apresentados somente o Mirceno, Cariofileno e Humuleno tiveram um perfil de variação construído, pois de acordo com gráficos de composicionais de origem comercial são tais voláteis os quais mais impactam na modificação do aroma de uma cerveja submetida ao DH. O perfil de variação de cada composto ao longo dos dias de DH está apresentado no Gráfico 2. Como explicitado, nesse gráfico é visto um crescimento na quantidade de Mirceno, Cariofileno e Humuleno a medida que o DH progride. Indo além dos compostos monitorados, como os acetatos de neril e geranil, geranato de metila e ésteres como octanoato de etila e nonanoato de etila, esses apresentam pequenas variações, contudo a origem dessa diferença se dá em reações secundárias não relacionadas ao DH. Por exemplo a redução do geraniol a  $\beta$ -citronelol sendo esta uma biotransformação dependente da variedade de fermento utilizada na produção (SHARP et al., 2017). Importante mencionar que a falta de amostras dos dias sequenciais foram determinantes para a não ampliação do perfil de variação observado e, por esse motivo, um novo teste foi feito com mais amostras ao longo do período de DH.

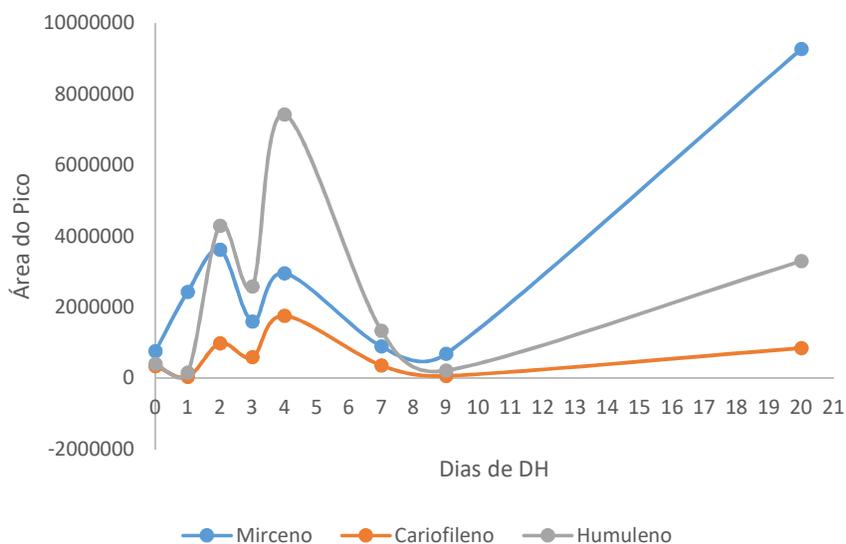
Gráfico 2: : Variação das áreas de Mirceno, Cariofileno e Humuleno a partir do dia 0 ao quarto dia de DH (IPA)



### 5.1.2. Amostras *American Pale Ale* (APA)

As amostras de APA analisadas foram submetidas às mesmas condições de extração e análise no GC e, por isso, a identificação não foi necessária dado que os compostos alvo escolhidos são os mesmos, a composição em ambas as matrizes são muito semelhantes e nenhuma coeluição foi observada. Esperava-se que o perfil de variação fosse semelhante, porém, o perfil apresentado no gráfico 2 foi totalmente diferente do observado no teste anterior. A variação não obedece um aumento ou diminuição consistente do início ao fim do processo, mas sim um aumento e diminuição periódico de um dia para outro. É válido apontar o grande intervalo de tempo entre as duas últimas amostras 6 e 7 que aconteceu devido a espera por uma possível estabilização de voláteis a partir da amostra 6. Contudo, o enorme crescimento das áreas das duas amostras finais somado a variação irregular detectada tornou necessária uma amostragem mais homogênea do processo.

Gráfico 3: Variação das áreas de Mirceno, Cariofileno e Humuleno observada nos testes preliminares (APA)



O comportamento observado pode ter sua origem nas seguintes possibilidades e suas consequências:

- I. Perda de voláteis durante a transferência da amostra do vial de armazenagem para o de extração. Muito tempo com o vial de armazenagem aberto pode ter acarretado em perdas de voláteis.
- II. Variações relacionadas a extração em SPME. A variação encontrada pode ter origem em pela extração estar ocorrendo fora do equilíbrio para os compostos monitorados. Dessa forma a otimização da temperatura e do tempo de extração podem auxiliar na redução da variação errática observada. Além da otimização do SPME, a utilização de um padrão interno também pode ajudar na determinação da fonte da variação como sendo originária do SPME e na diminuição de tais diferenças.
- III. Existência de Lúpulo particulado nos vials de armazenagem, o que implica em uma extração continua de voláteis pela cerveja nas amostras que se encontram com qualquer tipo de material particulado em suspensão (similar ao observado na Figura 12)

Figura 12: Foto de um vial de armazenagem com presença de lúpulo particulado.



- IV. Perda de voláteis durante o tempo de espera inerente à injeção automática. Para que a injeção automática seja utilizada, os vials com as amostras ficam por um crescente período de tempo fora da temperatura recomendada de armazenagem enquanto esperam para serem submetidos ao processo de extração e injeção. Da primeira para a segunda amostra há uma espera de 53 minutos entre o início da extração da primeira amostra até o início da extração da segunda amostra. Esse tempo é cumulativo para as amostras sequenciais, por exemplo o tempo de espera da extração da primeira amostra para a extração da terceira amostra é de 73 minutos. Consequentemente o tempo de espera para amostra 10 ser extraída é de 207 minutos

e todo esse tempo ela está fora dos parâmetros recomendados de armazenagem, possivelmente acarretando em perdas de analitos.

- V. Não homogeneidade da amostragem Além disso a não utilização de um padrão de coleta por parte do produtor contribuiu para a inserção de novas variáveis mais complexas de serem interpretadas sem um número adequado de replicatas. O produtor utilizava jatos de dióxido de carbono para recircular o lúpulo dentro do tanque, afim de tentar aumentar a extração de voláteis. Contudo a contribuição dessa ação não pôde ser verificada pela falta de registros que indicassem quais amostras foram coletadas antes da recirculação e quais foram coletadas após o procedimento.

Tendo em vista essas observações, ajustes no procedimento e no método foram feitos para os testes otimizados a fim de eliminar, ou ao menos minimizar, os problemas. Ademais o aumento do número compostos alvo avaliados, como o Linalol e Geraniol, os quais também são importantes para o aroma da cerveja submetida ao DH, pode conferir uma melhor compreensão da dispersão da variação por outros compostos de importância para o aroma da bebida. Outra preocupação pertinente a todas as etapas da análise em que a amostra não está apropriadamente armazenada é a sua exposição ao ar, aumentando assim a oxidação dos voláteis alvos deste trabalho. O procedimento ideal de análise seria a coleta diária das amostras e subsequente análise no GC-MS. Entretanto, em função do GC-MS ser um equipamento multiusuário, não foi possível a análise diária dessa amostra.

## 5.2. Testes otimizados

Para este conjunto de testes não foram utilizadas amostras de cervejarias, mas sim de cervejeiros caseiros, tendo como objetivo um maior controle sobre a forma de coleta e maior detalhamento do processo realizado, dada a facilidade de acesso ao produtor.

Em função das observações e hipóteses geradas a partir dos resultados preliminares, ajustes foram realizados ao método proposto inicialmente. A inclusão do Linalol e do Geraniol aos analitos de interesse foi necessária para verificar se a variação irregular se repete nele, mas também da sua importância para em regular o aroma de uma cerveja mesmo não estando apresentados explicitamente em materiais comerciais.

A amostragem foi modificada de forma a contemplar o período de DH de 10 dias com amostras coletadas diariamente e de uma *American Amber Ale* e uma *American Pale Ale* de dois produtores distintos, possibilitando a confecção de um conjunto de

dados que forneça uma visão mais precisa do processo. Os lúpulos utilizados nos DH, e suas respectivas quantidades, foram o El dorado (100 g) para o produtor 1 e o Columbus (100 g) para o produtor 2.

A análise das amostras foi realizada 1 mês após a coleta e armazenamento, o que pode ser um fator que contribua de alguma forma nas variações construídas (pela diminuição de analitos em função de algum grau de oxidação). A injeção automática foi configurada de forma a extrair e injetar uma amostra e sua replicata por vez, assim minimizando a perda de compostos de interesse devido ao tempo de espera entre injeções fora de condições recomendadas de armazenamento. Novas análises, com um menor intervalo de tempo entre coleta e análise são recomendadas para expansão da discussão.

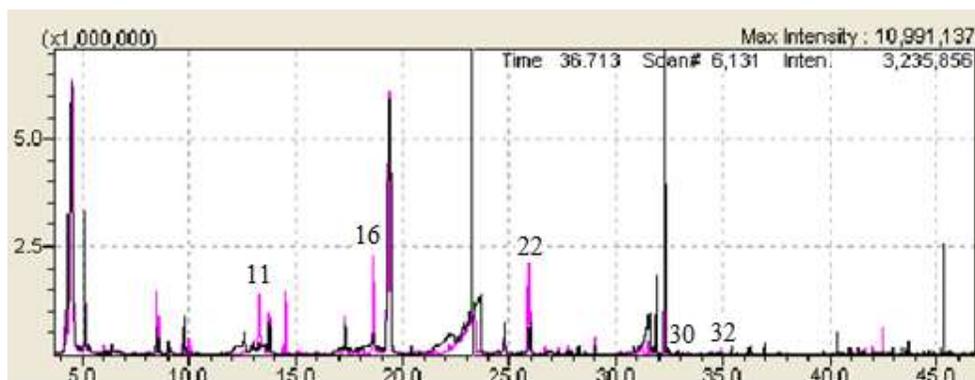
O padrão interno foi utilizado afim de detectar se umas das possíveis causas da variação previamente vista tem alguma relação com a extração feita, e além disso ele também pode apontar possíveis reações secundárias não associadas ao DH executado. O uso do NaCl foi feito com o intuito de interferir no equilíbrio durante a extração para se atingir o equilíbrio durante a extração por meio da diminuição da solubilidade dos compostos presentes na fase líquida por meio do efeito de “Salting out”, aumentando a sensibilidade do método de extração adotado.

As condições do SPME foram alteradas para uma temperatura de 60°C por 40 minutos para melhorar a extração de compostos mais pesados presentes ao final da corrida e verificar como essa alteração afeta os componentes mais leves da amostra. Com as 22 amostras analisadas foi possível construir dois perfis de variação para processo de DH distinto com duração de 11 dias.

### **5.2.1. *American Amber Ale* (AAA) Produtor 1**

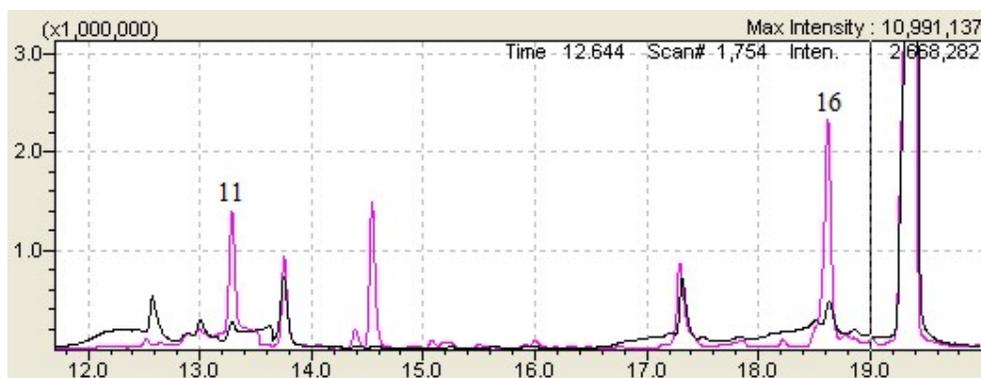
Segue um comparativo entre o último dia da maturação e o último dia do DH na Figura 13, seguido por três trechos ampliados do cromatograma total para melhor expor os picos numerados, Figuras 14 a 16 para a *American Amber Ale* do produtor 1.

Figura 13: Comparativo último dia da maturação e último dia do DH (dia 10) produtor 1



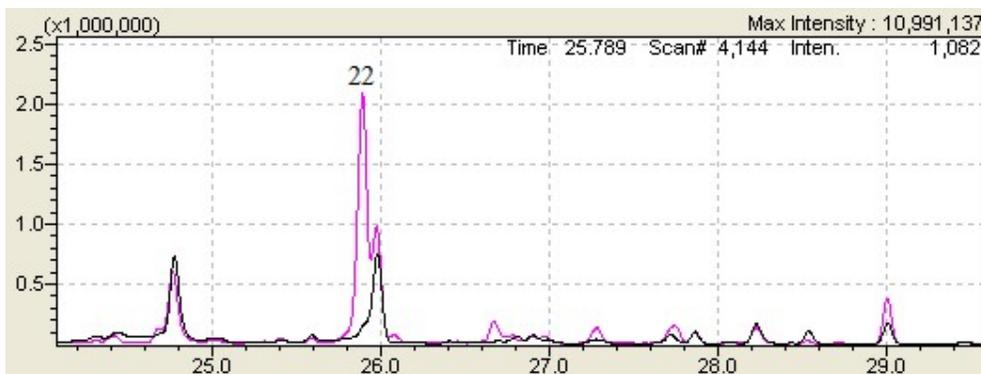
Legenda: Cromatogramas: (Preto) Ultimo dia da maturação; (Rosa) Quarto dia do DH. Picos: (11) Mirceno; (16) Linalol; (22) Geraniol; (30) Cariofileno; (32) Humuleno

Figura 14: Trecho 1 do cromatograma total



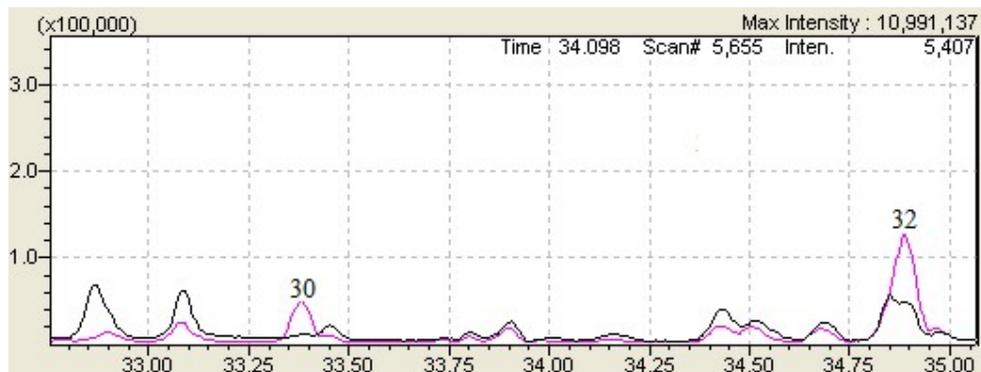
Legenda: Cromatogramas: (Preto) Ultimo dia da maturação; (Rosa) Quarto dia do DH. Picos: (11) Mirceno; (16) Linalol

Figura 15: Trecho 2 do cromatograma total



Legenda: Pico: Cromatogramas: (Preto) Ultimo dia da maturação; (Rosa) Quarto dia do DH. Pico: (22) Geraniol

Figura 16: Trecho 3 do cromatograma total

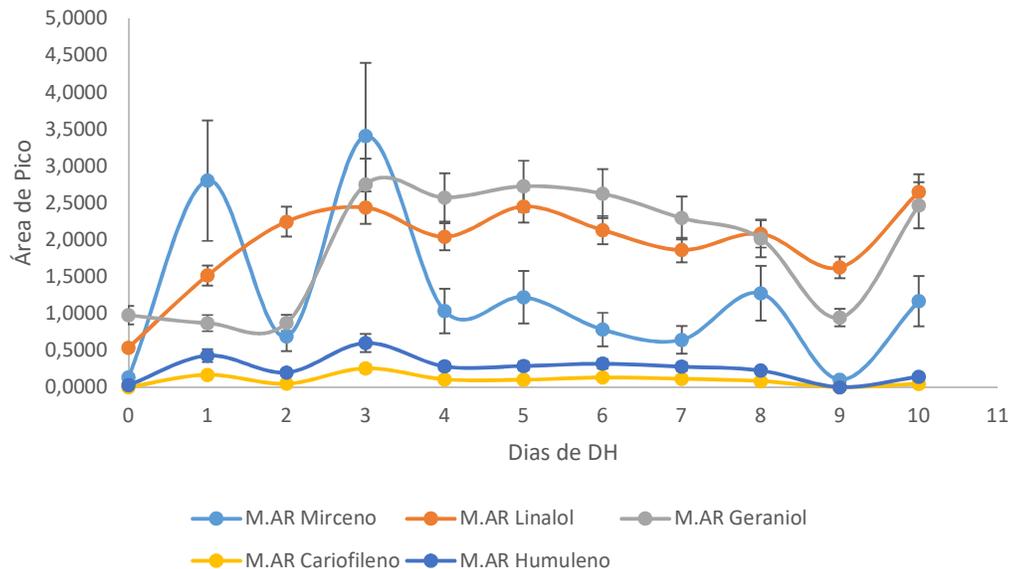


Legenda: Cromatogramas: (Preto) Ultimo dia da maturação; (Rosa) Quarto dia do DH. Picos: (30) Cariofileno; (32) Humuleno

Fonte: Do Autor

O Gráfico 4 gerado mostra que o mirceno foi o composto que apresentou a variação mais errática quando comparado com o restante dos compostos alvo, sejam eles terpenos ou compostos oxigenados. Considerando o comportamento do mirceno era esperado que os terpenos restantes, cariofileno e humuleno, demonstrariam um comportamento semelhante. Contudo, o padrão observado no cariofileno e no humuleno foi constante e em baixa quantidade durante todo o período de execução de DH, contrastando com observações feitas na amostra APA analisada nos testes iniciais, onde o comportamento de todos os três se mostraram semelhantes.

Gráfico 4: Perfil de Variação APA produtor 1; Média das Áreas Relativas das replicatas.

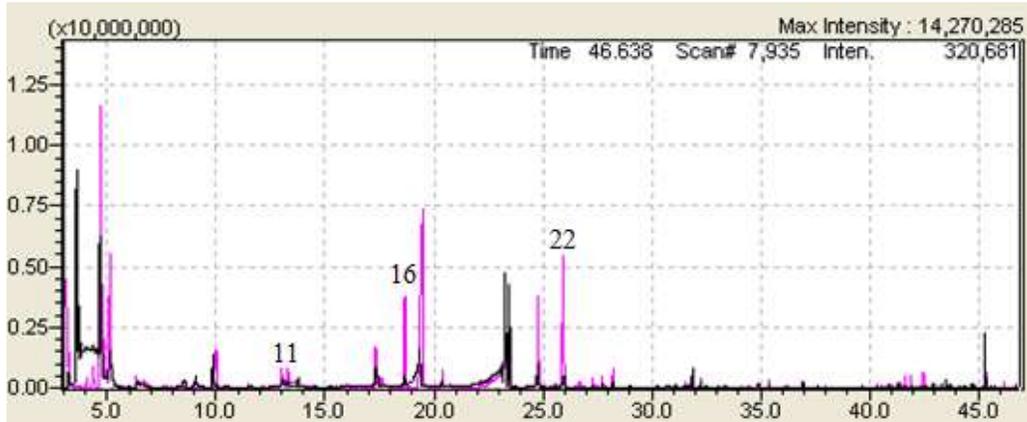


Olhando para os terpenóides, a variação constatada ao longo do processo de DH foi de crescimento constante para o linalol, seguido por certa estabilidade a partir do dia 3 do processo e uma leve queda no dia 9 (diminuição foi comum a todos os compostos alvo – pode ser algo relativo à extração). No caso do geraniol diferença observada quando comparado com o linalol se dá no salto de quantidade visto do dia 2 para o dia 3 do processo.

### 5.2.2. American Pale Ale (APA) Produtor 2

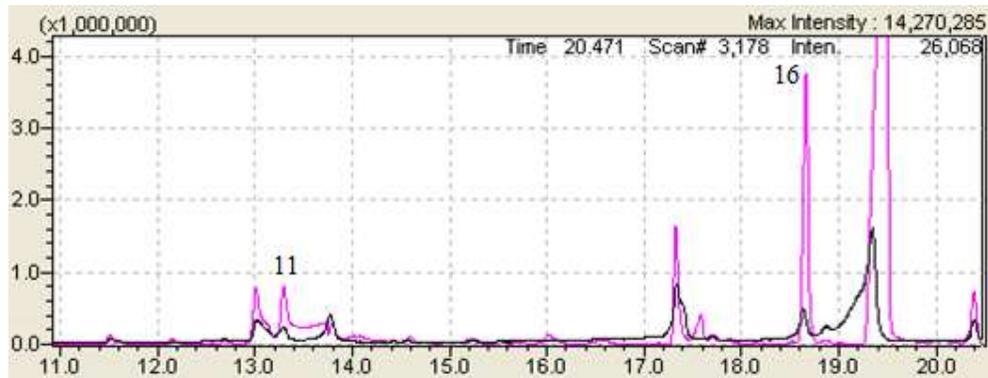
Seguem os cromatogramas gerados pelas análises da cerveja APA do último dia da maturação e do último dia do DH com os picos relacionados aos compostos de interesse indicados, assim como o Gráfico 5 constando os perfis de variação construídos dos analitos.

Figura 17: Comparativo entre o último dia da maturação e o último dia do DH (dia 10) produtor 2



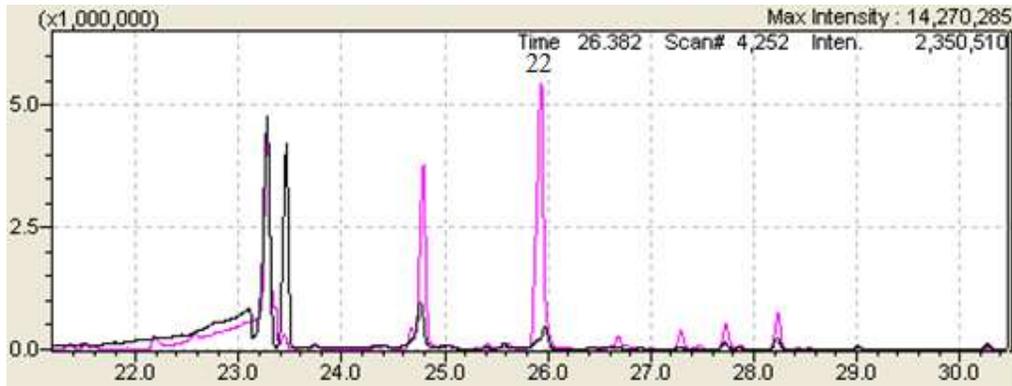
Legenda: Cromatogramas: (Preto) Ultimo dia da maturação; (Rosa) Último dia do Dry hopping, dia 10. Picos: (11) Mirceno; (16) Linalol; (22) Geraniol. O Cariofileno e o Humuleno não estão presentes nas amostras utilizadas na construção da figura.

Figura 18: Trecho 1 do cromatograma total.



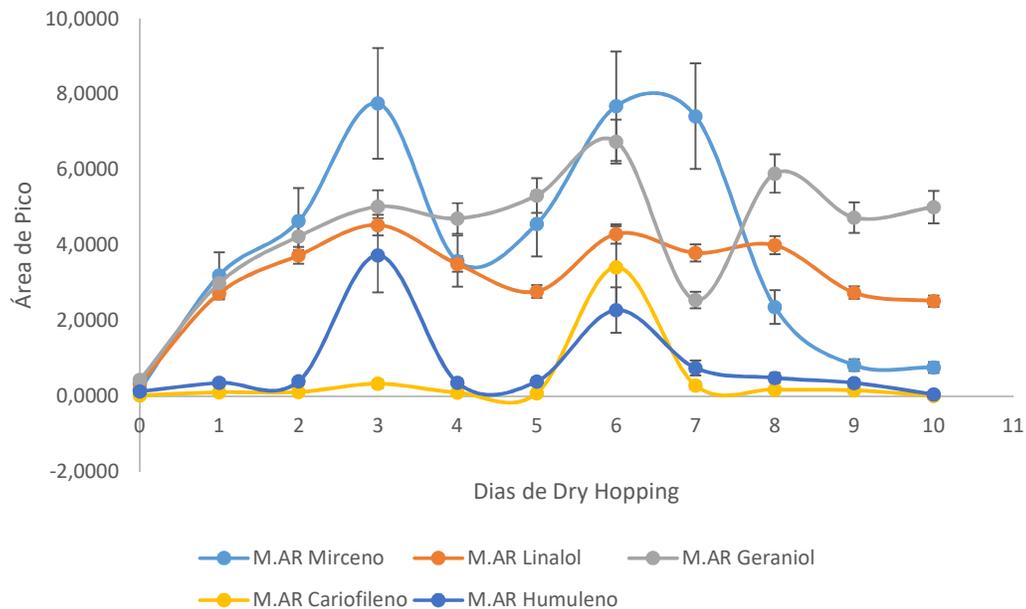
Legenda: Cromatogramas: (Preto) Ultimo dia da maturação; (Rosa) Último dia do Dry hopping, dia 10. Picos: (11) Mirceno; (16) Linalol.

Figura 19: Trecho 2 do cromatograma total.



Legenda: Cromatogramas: (Preto) Último dia da maturação; (Rosa) Último dia do Dry hopping, dia 10. Pico: (22) Geraniol.

Gráfico 5: Perfil de Variação APA produtor 2; Média das Áreas Relativas das replicatas



Ao analisar a variação associada ao mirceno nota se a maior irregularidade do dia 5 em diante, quando comparado a todos os outros compostos monitorados sejam eles terpenos e terpenóides. A irregularidade descrita referente ao mirceno contrasta com o padrão observado no cariofileno e no humuleno, algo não esperado dadas as observações feitas nos testes iniciais onde todos os três, apesar de serem irregulares,

apresentaram comportamentos similares. Além disso o padrão visto no cariofileno e humuleno apresentam elevações abruptas nos dias 3 e 6 do DH coincidentes com as elevações da quantidade de mirceno.

Em relação aos terpenóides monitorados nota-se uma variação crescente com quedas ao longo do processo. No caso do linalol nos dias 5,9 e 10 apresentaram quedas de pequena amplitude, enquanto no caso do geraniol no dia 7 apresentou um grande decréscimo em sua presença na amostra, logo retornando ao patamar observado no dia 6 seguido por pequenas quedas.

Comparando as variações entre os dois conjuntos de amostras o Linalol e o Geraniol foram os que apresentaram variações mais próximos levando em conta o perfil geral de crescimento nas primeiras 4 amostras analisadas e intercalação entre crescimento e queda da metade do DH em diante. Em relação ao Mirceno, Cariofileno e Humuleno tem-se variações distintas entre os dois conjuntos de amostras analisados.

Seria esperado que o comportamento do Mirceno tivesse semelhança mais clara com a variação vista no Linalol, de crescimento constante com a intercalação entre aumento, do início ao final do DH, e queda da metade para o final do DH, tendo em vista a proximidade de seus tempos de retenção e estruturas químicas. Possíveis razões para tal comportamento podem estar relacionado a perdas durante o período de armazenagem e extração devido a má vedação proporcionada pelo vial utilizado, local de armazenagem fora da temperatura para conservação de uma maior quantidade de voláteis e variações de extração.

## 6. Conclusão

Com os resultados discutidos é possível concluir que o perfil de variação dos voláteis responsáveis pelo aroma de uma cerveja submetida ao DH apresenta muita variação ao longo do processo. Contudo, ao comparar os dias de DH ao tempo zero há um aumento perceptível na maioria dos compostos analisados indicando que há extração efetiva desses compostos para os estilos *American Pale Ale* e *American Amber Ale*. Além disso, os dados e análises aqui apresentados não foram suficientes para determinar o período mais adequado de submissão da cerveja ao DH para se obter uma relação clara entre o período de prática da etapa de DH e a composição da fração volátil extraída para a bebida. Dentre as irregularidades observadas, a mais importante a ser mencionada é a do Mirceno já que ele é o composto comum a todas as amostras analisadas, assim como o de maior quantidade, e também o mais volátil.

O comportamento descrito pode ter tido sua origem em problemas com variações associadas ao método de extração empregado devido a não otimização de extração para os analitos estudados. Também pode ser fruto de problemas associados ao período e estrutura de armazenagem da amostra prévia a análise, em que os analitos buscados podem ter sofrido reações secundárias, terem sido volatilizados para o ambiente, logo reduzindo sua presença na bebida. A coleta da amostra é outro ponto de importância na diminuição de problemas durante as análises sabendo que a presença de material particulado juntamente com a bebida coletada pode modificar a fração volátil presente na cerveja coletada. Em suma estudos destinados à compreensão e mapeamento do comportamento da fração volátil de cervejas submetidas ao DH, assim como outras vertentes relacionadas a esse processo adicional da produção cervejeira, necessitam de expansão. Isso se dá devido à relação direta entre um melhor entendimento do processo de produção da cerveja e a qualidade da bebida produzida.

## 7. Bibliografia

BAMFORTH, C. W. et al. **Beer: A Quality Perspective**. [s.l.: s.n.].

BARTH, R. **The Chemistry of Beer: The Science in the Suds**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2013.

BASER, K. H. C. et al. **Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications**. Second Edi ed. [s.l.] CRC Press, 2010.

BERGER, L. I. et al. **Handbook of chemistry and physics**. [s.l.: s.n.].

BIENDL, M. et al. **Hops: their Cultivation, Composition, and Usage**. [s.l.] Fachverlag Hans Carl GmbH, 2014.

BOJKO, B. et al. SPME - Quo vadis? **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 132–151, 2012.

BOULTON, C. (CHRISTOPHER M. . **Encyclopedia of Brewing**. [s.l.: s.n.].

EYRES, G. et al. Identification of character-impact odorants in coriander and wild coriander leaves using gas chromatography-olfactometry (GCO) and comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry (GC×GC–TOFMS). **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 9-10, p. 1061–1074, 1 jun. 2005.

EYRES, G.; DUFOUR, J. P. Hop essential oil: Analysis, chemical composition and odor characteristics. In: **Beer in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 239–254.

FENG, S. **Aroma-Active Compounds in ‘Centennial’, ‘Citra’ and ‘Nelson Sauvin’ Hop Varieties and Their Aroma Contribution to Dry-Hopped Beer**. [s.l.] Oregon University, 2014.

FORSTER, A.; GAHR, A. On the fate of certain hop substances during dry hopping. **BrewingScience**, v. 66, n. 7–8, p. 93–103, 2013.

GRIZOTTO, P. A. PERFIL SENSORIAL DO AROMA DE LÚPULO (*Humulus lupulus*) BRASILEIROS. 2017.

GROSS, E. **Hops in their Botanical and commercial Aspect**. [s.l.] Scott, Greenwood

and Co., 1900.

HIERONYMUS, S. **For the love of Hops: the practical guide to aroma, bitterness, and the culture of hops.** [s.l.] Brewers Publications, 2012.

HILLESHEIM, E. L.; MIGNONI, M. L. **Química das Bebidas 1.** [s.l.] EdiFAPES, 2018.

KISHIMOTO, T. et al. Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4701–4707, 2005.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. **Evolution of solid-phase microextraction technology.** [s.l.: s.n.]. v. 885

MARCUSSO, E. F.; MÜLLER, C. V. ANUÁRIO DA CERVEJA NO BRASIL 2018: Crescimento e Inovação. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.**, n. 72, 2018.

MC NAIR, H.; MILLER, J. **Basic Gas Chromatography.pdf**, 1997.

NOGUEIRA, A. Desenvolvimento, avaliação e aplicações de novas fases para extração por sorção em barra de agitação (SBSE). **Universidade de São Paulo**, 2007.

PALMER, J. J. **How to Brew: Everything You Need to Know to Brew Beer Right the First Time.** 3rd. ed. [s.l.] Brewers Publications, 2006.

PIRES VALENTE, A. L.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 523–530, 2000.

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

SHARP, D. C. et al. Contributions of Select Hopping Regimes to the Terpenoid Content and Hop Aroma Profile of Ale and Lager Beers. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 75, n. 2, p. 93–100, 2017.

SHARPE, F. R.; LAWS, D. R. J. THE ESSENTIAL OIL OF HOPS A REVIEW. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 87, n. 2, p. 96–107, 4 mar. 1981.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. Organic Chemistry. **John Wiley & Sons Inc.**, v. 10, n. 1, p. 1277, 2012.

STANDAGE, T. **A History of the World in 6 Glasses**. Tradução d ed. [s.l.] Zahar, 2005.

STEENACKERS, B.; DE COOMAN, L.; DE VOS, D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. **Food Chemistry**, v. 172, p. 742–756, 2015.

STEINHAUS, M.; SCHIEBERLE, P. Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hop cones (*Humulus lupulus* L. variety spalter select) based on GC-olfactometry and odor dilution techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1776–1783, 2000.