



**ANDRESSA KÉSSIA DE OLIVEIRA KOPKE**

**INVESTIGAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DA FRAÇÃO  
VOLÁTIL DA CERVEJA *AMERICAN PALE ALE*  
SUBMETIDA AO PROCESSO DE *DRY HOPPING***

**LAVRAS – MG  
2021**

**ANDRESSA KÉSSIA DE OLIVEIRA KOPKE**

**INVESTIGAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL DA CERVEJA  
*AMERICAN PALE ALE* SUBMETIDA AO PROCESSO DE *DRY HOPPING***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de Lavras, como parte das  
exigências do Curso de Química (Licenciatura  
Plena), para a obtenção do título de Licenciado.

Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso  
Orientador

Ma. Letícia Fagundes Pereira  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2021**

**ANDRESSA KÉSSIA DE OLIVEIRA KOPKE**

**INVESTIGAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL DA CERVEJA  
*AMERICAN PALE ALE* SUBMETIDA AO PROCESSO DE *DRY HOPPING***

**CHEMOMETRIC INVESTIGATION OF THE VOLATILE FRACTION OF  
BEER AMERICAN PALE ALE SUBMITTED TO THE DRY HOPPING  
PROCESS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de Lavras, como parte das  
exigências do Curso de Química (Licenciatura  
Plena), para a obtenção do título de Licenciado.

APROVADO em 24 de novembro de 2021.  
Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso - UFLA  
Profa. Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães - UFLA  
Prof. Dr. Cleiton Antônio Nunes - UFLA

Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso  
Orientador

Ma. Letícia Fagundes Pereira  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2021**

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Janice, agradeço pelo incentivo e atenção ao longo da elaboração desse trabalho, por todo seu carinho, por sua dedicação e pelo amor incondicional. Obrigada pelo exemplo de força, caráter e determinação!

Ao meu pai, Leonardo, por sempre acreditar e investir no meu potencial, por todo seu amor e cuidado, por não medir esforços para me ver feliz.

À minha madrasta, Lara, que encheu meu coração de amor e tranquilidade. Suas palavras de incentivo e otimismo me fortalecem.

Ao meu padrasto Sirley, pelo apoio e auxílio em muitos momentos.

Aos meus irmãos Vinícius, Maria Clara e Malu, por todo amor, companheirismo e alegria. Vocês iluminam a minha vida!

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

Ao Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso, pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança e disponibilidade.

À minha coorientadora Ma. Letícia Fagundes Pereira, pelo incentivo, partilhas e pelas valiosas sugestões.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães, por todo os ensinamentos e carinho, por aceitar fazer parte da banca e por contribuir para a finalização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Cleiton Antônio Nunes, pela disponibilidade de fazer parte da banca examinadora e pelas contribuições a este projeto.

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Química Analítica (LPQA), por todo apoio e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos Pedro Micael, Vitória, João, Pedro Santos e Karol, por toda amizade, apoio e cumplicidade. Obrigada por tornarem meus dias mais leves e divertidos.

Às minhas amigas, Kayane e Hadassa, por estarem sempre presentes na minha vida, por todos os momentos compartilhados, pelas risadas e conselhos. Vocês foram fundamentais para essa conquista.

Aos meus avós, Janice e Vitor, por terem me ensinado valores que carrego comigo em todos os momentos. Aos meus primos Arthur, Laisla e André, por estarem sempre comigo. Ao Tio Vitor e Tia Val, pelo apoio e carinho.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação, o meu muito obrigada.

## RESUMO

Esta pesquisa buscou a identificação de compostos voláteis, por meio de métodos quimiométricos, em amostras de cervejas artesanais do estilo *American Pale Ale* (APA), conforme o tempo de exposição do lúpulo durante o processo de *dry hopping* (DH). Para isso, amostras de cerveja artesanal do estilo APA foram coletadas, em duplicata, de dois em dois dias ao longo do processo de DH. A primeira coleta ocorreu no último dia de fermentação, antes de dar início ao processo, quando foram adicionados 125 g de *Amarillo* para 25 L de cerveja. As amostras de cerveja foram submetidas previamente à microextração em fase sólida (SPME) e, posteriormente, à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Foram identificados em média 30 compostos. Para a interpretação da grande quantidade de informações contidas nos cromatogramas aplicou-se a análise de componentes principais (PCA). Dessa forma, foi possível a identificação de diferenças entre as amostras estudadas, com destaque para os compostos que alteram sua intensidade no decorrer do DH, o que permitiu a separação das amostras conforme o tempo de DH e das etapas de fermentação e maturação, havendo a clara separação entre as amostras coletadas antes do processo, no dia final e nos dias intermediários, o que revela as alterações causadas no perfil volátil das amostras. Os compostos presentes em grande quantidade nos óleos essenciais do lúpulo, como  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno, farneseno e os compostos derivados desses, apresentaram as variações mais significativas para essa separação, uma vez que o aumento de tempo de DH acentuou o teor desses na bebida. Os resultados também mostraram que determinados compostos identificados são produzidos ou intensificados durante outras etapas da produção da cerveja, como ésteres e álcoois, igualmente responsáveis pela discriminação das amostras.

**Palavras-chave:** Compostos voláteis. Microextração em fase sólida. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Quimiometria. Cerveja artesanal.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração de processo de fabricação de cerveja com destaque aos pontos mais comuns de adição de lúpulo e seus nomes. ....	17
Figura 2 – Estrutura química de hidrocarbonetos, compostos oxigenados e sulfurados presentes no óleo essencial do lúpulo. ....	19
Figura 3 – Dispositivo utilizado em micro extração em fase sólida (SPME). ....	25
Figura 4 – Processo de extração e dessorção dos analitos utilizando amostrador de SPME e GC. ....	26
Figura 5 – Cromatograma referente a amostra do terceiro dia de DH com a identificação dos compostos presentes na Tabela 4. ....	39
Figura 6 – (A) Cromatogramas sobrepostos em uma matriz e desalinhados; (B) Fragmento dos cromatogramas sobrepostos em uma matriz e desalinhados; (C) Cromatogramas sobrepostos em uma matriz e alinhados; (D) Fragmento dos cromatogramas sobrepostos em uma matriz e alinhados. ....	42
Figura 7 – Gráfico de <i>scores</i> PC1 x PC2 das doze amostras de cerveja. ....	43
Figura 8 – Gráfico de <i>loadings</i> da Componente Principal 1 (PC1). ....	45
Figura 9 – Gráfico de <i>loadings</i> da Componente Principal 2 (PC2). ....	46

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Principais constituintes encontrados em flores secas de lúpulo. ....	18
Tabela 2 – Características aromáticas dos principais compostos presentes no óleo essencial do lúpulo. ....	21
Tabela 3 – Amostras de cerveja coletadas em função do tempo de DH. ....	35
Tabela 4 – Compostos identificados nas amostras de cervejas empregadas no estudo. .	38

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1.....	36
----------------	----



## LISTA DE ABREVIATURAS

AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
APA	<i>American Pale Ale</i>
COW	<i>Correlation Optimized Warping</i> (do inglês <i>Correlation Optimized Warping</i> )
CW/DVB	Carbowax/divinilbenzeno
DH	<i>Dry Hopping</i>
GC	Cromatografia Gasosa (do inglês <i>Gas Chromatography</i> )
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (do inglês <i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> )
GLC	Cromatografia Líquido-Gás (do inglês <i>Gas-Liquid Chromatography</i> )
GSC	Cromatografia Sólido-Gás (do inglês <i>Gas-Solid Chromatography</i> )
HS-SPME	Microextração em fase sólida por <i>headspace</i> (do inglês <i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> )
IBU	<i>International Bitterness Units</i>
IR	Índice de Retenção
LLE	Extração Líquido-Líquido (do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i> )
LTPRI	Índice de Retenção com Programação Linear de Temperatura (do inglês <i>Linear Temperature Programmed Retention Index</i> )
MS	Espectrometria de Massas (do inglês <i>Mass Spectrometry</i> )
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>
PA	Poliacrilato
PCA	Análise de Componentes Principais (do inglês <i>Principal Component Analysis</i> )
PCs	Componentes Principais (do inglês <i>Principal Components</i> )
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
PDMS/DVB/CAR	Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno/carboxen

SFE	Extração com Fluido Supercrítico (do inglês <i>Supercritical Fluid Extraction</i> )
SPE	Extração em Fase Sólida (SPE, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i> )
SIM	Monitoramento Seletivo de Íon (do inglês <i>Selected Ion Monitoring</i> )
SPME	Microextração em Fase Sólida (do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i> )

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 Objetivo geral .....	13
2.2 Objetivos específicos .....	13
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
3.1 Breve história da cerveja .....	14
3.2 Produção das cervejas.....	14
3.3 O Lúpulo.....	17
3.4 Preparo de amostras.....	23
3.5 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) .....	28
3.6 Quimiometria.....	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
4.1 Materiais .....	34
4.2 Amostras .....	34
4.3 Preparo e análise de amostras .....	35
4.4 Identificação dos compostos.....	36
4.5 Emprego dos modelos quimiométricos .....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>38</b>
5.1 Identificação da fração volátil .....	38
5.2 Análises Quimiométricas.....	41
5.2.1 Análises de Componentes Principais (PCA) .....	43
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Cerveja é uma bebida alcoólica, carbonatada, preparada por meio da fermentação de cereais maltados como a cevada e o trigo. Historicamente, o domínio da técnica da produção de cerveja possui cerca de 8000 anos, com sua provável origem no Oriente Médio, especificamente na região da Mesopotâmia (DRAGONE *et al.*, 2016).

As principais matérias primas empregadas na fabricação da cerveja são água, malte, lúpulo e fermento. A fabricação da cerveja abrange diversas etapas, sendo indispensável a moagem, mosturação, filtração, fervura, fermentação, maturação e envase. Brevemente, a etapa de moagem consiste na quebra do malte em pequenos fragmentos. Na mosturação ocorre a mistura do malte moído à água aquecida em temperatura controlada, objetivando a produção de açúcares fermentáveis. A filtração é necessária para separar o bagaço da cevada do mosto. Em seguida, a fervura visa a esterilização e concentração do mosto, e ocorre a adição do lúpulo para conferir amargor e aroma à cerveja (FILHO E CEREDA, 2001; MORADO, 2017). Na etapa de fermentação ocorre a transformação de carboidratos em etanol e CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a maturação encarrega-se de aperfeiçoar características (aroma e sabor) e a aparência da cerveja. Por fim, efetua-se o envase e rotulagem do produto (AFONSO E ROSA, 2015).

O lúpulo é um dos ingredientes principais na fabricação da cerveja em virtude de suas propriedades de sabor e aroma. A composição geral dos lúpulos compreende vários constituintes, sendo que os primordiais, para o perfil organoléptico e para a qualidade da cerveja, são as resinas e os óleos essenciais (ROBERTS E FALCONER, 2018; ALMAGUER *et al.*, 2014).

Todavia, durante o processo de fervura pode ocorrer a perda, por volatilização, da maioria dos compostos de aroma relacionados ao lúpulo. Em alternativa, adiciona-se lúpulo à cerveja durante ou após a fermentação, a fim de provocar uma alteração significativa no perfil aromático da bebida (OLIVER *et al.*, 2020). Tal técnica, utilizada para elevar a concentração dos compostos voláteis de lúpulo na cerveja, é denominada de *dry hopping* (DH).

A técnica de DH, bastante comum em grandes cervejarias estrangeiras, vem adquirindo visibilidade e sendo aplicada até por micro e grandes cervejarias no Brasil. Tal fato relaciona-se com a aparição de muitos cervejeiros artesanais que buscam ressaltar sabores e, principalmente, aromas originados de lúpulo. Apesar disso, na perspectiva da ciência cervejeira, o DH é um assunto não muito discutido, apresentando poucas pesquisas que avaliam as modificações durante este processo em relação com a sua influência sob a fração volátil da bebida. Possivelmente, esse tipo de informação é mantido em segredo nas grandes cervejarias.

Sendo assim, para a melhor compreensão do tema, o processo de DH ainda necessita de muitos estudos sobre as diversas vertentes associadas à técnica.

A investigação da composição dos compostos voláteis ao longo do processo de DH pode ser efetuada por meio da microextração em fase sólida (SPME) e da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). A SPME fundamenta-se na adsorção de analitos voláteis a uma fibra de sílica fundida revestida com algum sorvente (MATA *et al.*, 2004). As etapas de separação, de identificação e de quantificação normalmente são realizadas pela GC-MS em razão de apresentarem simples operação, elevada seletividade e sensibilidade, além da minimização de interferências (SKOOG *et al.*, 2006).

Na busca por reconhecimento de padrões para melhor visualização e interpretação dos resultados obtidos mediante as análises de SPME e GC-MS, a aplicação de métodos quimiométricos é uma alternativa. Nesse cenário, a Quimiometria é a área que utiliza métodos matemático-estatísticos para planejar e otimizar procedimentos e para a obtenção de informações químicas de forma mais simplificada, convertendo-as em conhecimentos quantitativos do componente ou propriedades de interesse (FERREIRA *et al.*, 1999).

Diante disso, o presente trabalho buscou empregar técnicas de SPME e GC-MS para a determinação de compostos voláteis na cerveja *American Pale Ale* (APA) submetida ao processo de DH, com o intuito de avaliar alterações no perfil aromático da cerveja ao longo desse processo, através de métodos quimiométricos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Identificar a variação de compostos voláteis, por meio de métodos quimiométricos, em amostras de cervejas artesanais conforme o tempo de exposição ao lúpulo durante o processo de DH.

### **2.2. Objetivos específicos**

- ✓ Coletar amostra de cerveja artesanal submetidas ao processo de DH e empregar a SPME para extração de compostos voláteis.
- ✓ Identificar analitos presentes nas amostras de cerveja através da GC-MS.
- ✓ Identificar alterações do perfil volátil das cervejas ao longo do processo de DH utilizando a PCA.

### **3. REFERÊNCIAL TEÓRICO**

#### **3.1. Breve história da cerveja**

A história da cerveja tem seu início em uma época imprecisa. Acredita-se que a descoberta do processo de fabricação tenha ocorrido acidentalmente graças a grãos de cereais fermentados espontaneamente ou da própria massa do pão exposta à água. Tal cenário supostamente se deve ao fato de que há uma relação direta entre pão e cerveja, uma vez que ambos produtos contêm ingredientes semelhantes e valores nutricionais próximos. Além do mais, por um período determinado da evolução da civilização, tanto o pão quanto a cerveja estiveram presentes na alimentação diária e na cultura de diferentes povos (MORADO, 2017).

Historicamente, a cerveja era produto de prática e responsabilidade feminina, sendo destinada ao consumo familiar. Entretanto, foi durante a Idade Média, nos mosteiros, que os primeiros projetos sistematizados para obtenção e comercialização de cerveja progrediram. Nessa época, foi realizado o aperfeiçoamento das receitas e dos métodos de produção, tendo o conceito de conservação a frio da bebida fermentada um dos procedimentos instaurados. À vista disso, os monges eram considerados importantes pesquisadores de cerveja em virtude do forte compromisso de desenvolver e preservar conhecimentos e técnicas a respeito da fabricação da bebida (MEUSSDOERFFER, 2009).

No Brasil, a cerveja demorou para aparecer. Segundo Santos (2003), a população brasileira tinha como hábito o consumo da cachaça, além de licores e vinhos importados, estes destinados somente à elite. Inicialmente, no século XVII, com a presença da Companhia das Índias Orientais, houve uma tentativa dos holandeses de incorporar a venda da bebida no país. No entanto, no início do século XIX, o produto reaparece com a vinda da família real portuguesa para o território brasileiro. Com o grande número de imigrantes chegando ao Brasil e com a abertura dos portos, a cerveja é tanto importada de países europeus como também se inicia uma produção artesanal interna no Sul e no Sudeste do país.

#### **3.2. Produção das cervejas**

Conforme a Instrução Normativa nº 65 do Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento publicado em 11 de dezembro de 2019, “cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de

lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro” (BRASIL, 2019a).

As principais matérias primas empregues na fabricação da cerveja são, sobretudo, água, malte, lúpulo e fermento. A água é a matéria-prima majoritária do produto, em torno de 92% a 95% do volume total. De acordo com a legislação brasileira, a água potável utilizada na fabricação da cerveja deve ser analisada por processos físico-químicos que lhe garanta as características necessárias para uma qualidade ideal da bebida (BRASIL, 2009b). Malte é o grão da cevada que passou pela técnica de maltagem, a qual é dividida em três etapas: maceração, germinação e secagem. A cevada é rica em amido, que é transformado, durante a mosturação, em açúcares fermentáveis, como maltose e glicose. O malte de cevada é a principal matéria prima da cerveja, concedendo aroma, sabor e corpo característico à bebida, entretanto pode-se adicionar outros cereais, como milho, arroz, trigo e aveia (MORADO, 2017; KUNZE, 2004; BELETI *et al.*, 2012). O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma planta trepadeira perene, que gera flores abundantes em resinas, polifenóis (como propriedades antioxidantes) e óleos essenciais. A composição do lúpulo confere à cerveja aromas, amargor e influenciam na estabilidade do sabor e da espuma (KUNZE, 2004; DURELLO *et al.*, 2019). As leveduras utilizadas para a fermentação alcoólica pertencem ao gênero *Saccharomyces*, que no decorrer do processo de fermentação convertem os açúcares fermentáveis presentes no mosto em álcool e gás carbônico (BARNETT, 2000).

O processamento da cerveja abrange as principais etapas: moagem, mosturação, filtração, fervura, fermentação, maturação e envase. Na moagem, o malte é quebrado em pequenos fragmentos, tendo sua casca cortada de forma a expor o tecido amiláceo para viabilizar o ataque das enzimas, ao longo da etapa de mosturação, quebrando o amido em açúcares. (FILHO E CEREDA, 2001).

A segunda etapa é a mosturação ou brassagem, sendo o procedimento responsável pela obtenção do mosto a partir das matérias primas cervejeiras. Nesse momento é realizada a adição do malte moído à água, em temperaturas controladas e por um tempo específico (BAMFORTH, 2017). Conforme Palmer (2017), durante a mostura acontece a reação de hidrólise do amido, essa catalisada pelas enzimas alfa e beta amilase, levando à obtenção de açúcares fermentáveis e não fermentáveis. Em seguida efetua-se a filtração que tem o dever de separar o bagaço do malte do mosto líquido, resgatando o máximo de extrato que se mantém contido na torta de filtro (BLEIER E CALLAHAN *et al.*, 2013).

A etapa de fervura tem o objetivo de estabilizar o mosto nos princípios biológico, bioquímico e coloidal, bem como determinar propriedades fundamentais no produto final, como



cor, aroma e sabor, isso devido à reação com os açúcares e aminoácidos presentes no mosto. Para que o mosto seja esterilizado e livre de microrganismos, é essencial que esse processo decorra de forma intensa e, com boa exaustão dos vapores, impede-se que os compostos voláteis indesejáveis (aldeídos), formados e evaporados nessa etapa, se condensam e retorne ao mosto. No decorrer desse procedimento é adicionado o lúpulo para proporcionar amargor, aromas, coagular proteína e inativar enzimas (MORADO, 2017; FILHO E CEREDA, 2001).

Na fermentação ocorre a conversão, pela levedura e sob condições anaeróbicas, de açúcares em gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) e etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ). Ao longo dessa etapa os carboidratos fermentáveis, como maltose, maltotriose, glicose, são metabolizados pela levedura, levando a formação de inúmeros subprodutos que conferem aromas agradáveis ou indesejáveis, como ésteres, álcoois e compostos sulfurados. Nesse contexto, tende-se a realizar a fermentação de modo que favoreça aromas desejáveis à bebida (WYLER, 2013; MORADO, 2017; STEWART *et al.*, 2018).

As cervejas podem ser classificadas, em razão do processo fermentativo, em dois estilos: *Ale* e *Lager*. As cervejas *Ale* utilizam a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em temperaturas entre  $15^\circ\text{C}$  a  $25^\circ\text{C}$ , essas consideradas de alta fermentação devido as leveduras se manterem sob a superfície do líquido durante a fermentação. Já em relação as cervejas *Lager*, utiliza-se a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* em temperaturas entre  $7^\circ\text{C}$  a  $12^\circ\text{C}$ , sendo essas de baixa fermentação, visto que as leveduras se encontram depositadas ao fundo da cuba ao longo ou após o processo de fermentação (JUNIOR *et al.*, 2009; RUVALCABA *et al.*, 2019).

A maturação, também conhecida como fermentação secundária, efetua-se em temperatura inferior à fermentação para que ocorra reações físico-químicas capazes de alterar a aparência da cerveja e que aprimoram determinados aromas e sabores. O repouso da bebida à baixa temperatura contribui para a complexação e precipitação de proteínas e polifenóis, além de resíduos de leveduras que provocam turbidez no líquido, favorecendo a clarificação. Nessa etapa também ocorre a carbonatação natural da cerveja como consequência da contrapressão executada pelo próprio tanque de maturação devido ao gás carbônico originado na fermentação, além dessa minimizar a concentração de compostos desagradáveis, como o ácido sulfídrico, acetaldeído e diacetil. Durante o período de maturação são formados ésteres que fornecem aromas e sabores específicos à cerveja. Por outro lado, os álcoois superiores e ácidos graxos são gerados ao longo da fermentação e não se alteram significativamente na etapa de maturação (PALMER, 2017; TAYLOR, 2018). Por fim, a cerveja é estocada em tanques e, logo após, efetua-se o envase e rotulagem do produto.

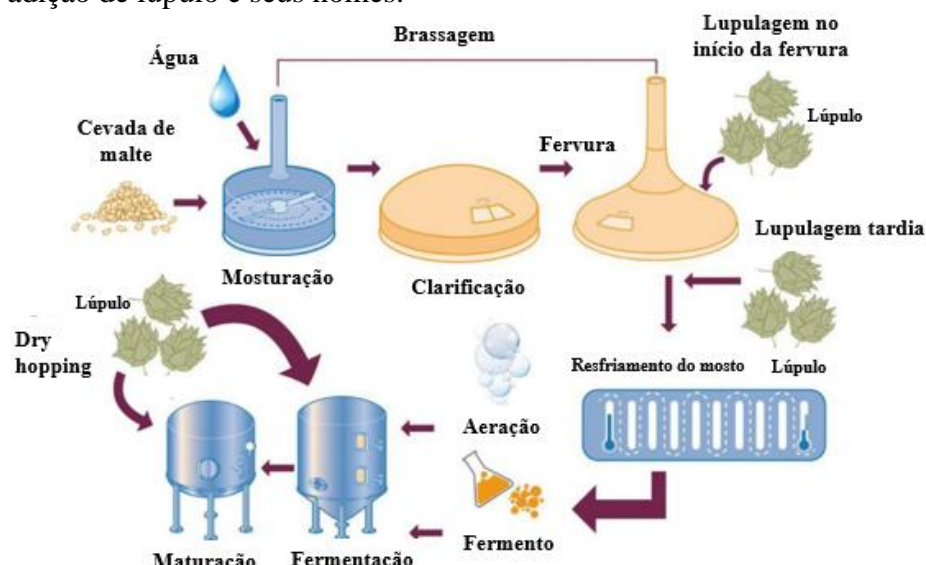
### 3.3. O Lúpulo

Conforme Zhang *et al.* (2004), o lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma planta de grande interesse econômico cultivada de forma ampla no mundo por sua inflorescência feminina, geralmente chamada de “cones de lúpulo” ou “lúpulo”. Estima-se que o cultivo do lúpulo ocorre desde 200 d.C. na Babilônia e os registros de seu uso para fabricação de cerveja surgem apenas por volta de 1079 (MOIR, 2000).

Embora o lúpulo seja dióico, isto é, apresenta uma taxa de plantas masculinas e femininas, a importância industrial incide sobre as plantas femininas, precisamente sobre as flores ou frutos resultantes delas. Essas são ricas em glândulas de lupulina, substância encarregada pela secreção de um pó amarelo, que possuem componentes como polifenóis, resinas e óleos essenciais, sendo estes responsáveis pelo aroma e amargor característicos da cerveja. Além do mais, o lúpulo apresenta ação antisséptica, atua como um conservante natural e auxilia na estabilidade do sabor e da espuma da bebida (FILHO E CEREDA, 2001; PALMER, 2017).

A adição da flor do lúpulo (fresca ou em *pellet*) pode ocorrer em várias etapas do processo de fabricação da cerveja, no decorrer da fervura ou ao longo da etapa de fermentação ou maturação. Apesar disso, pode-se empregar produtos do lúpulo, como seu extrato, em todas as etapas cervejeiras, até mesmo após a filtração (GUIMARÃES, 2021). A Figura 1 ilustra as etapas mais comuns para a adição do lúpulo no processo de fabricação da cerveja.

**Figura 1.** Ilustração de processo de fabricação de cerveja com destaque aos pontos mais comuns de adição de lúpulo e seus nomes.



Fonte: Adaptado de Ghesti *et al.* (2018).

Sendo um dos ingredientes principais na fabricação da cerveja em virtude de suas propriedades de sabor e aromas, o lúpulo tem um impacto crucial na qualidade da bebida e grande importância para a indústria cervejeira, uma vez que é viável produzir cervejas completamente diferentes, em relação à amargor e aroma, variando-se o tipo e/ou a quantidade de lúpulo em uma mesma receita. Vale ressaltar que as cervejas são divididas em dois grandes grupos conforme o processo de fermentação e, em cada estilo, o lúpulo empregue proporciona uma característica intrínseca em unidade de amargor, intitulada IBU (*International Bitterness Units*) (GRAHAM E FERGUS, 2006; ALMAGUER *et al.*, 2014).

A composição geral de cones de lúpulo secos, em consequência da presença das glândulas de lupulina, compreende vários constituintes, como resinas, óleos essenciais, proteínas, polifenóis, lipídios, ceras, celulose e aminoácidos. Os principais constituintes para a produção da cerveja são as resinas e os óleos essenciais (ALMAGUER *et al.*, 2014; ROBERTS E FALCONER, 2018). A Tabela 1 exibe as principais classes de constituintes presentes em flores secas de lúpulo e suas respectivas quantidades médias.

**Tabela 1.** Principais constituintes encontrados em flores secas de lúpulo.

<b>Constituinte</b>	<b>Quantidade % (m/m)</b>
Resinas Totais	15 - 30
Óleos Essenciais	0.5 - 3
Proteínas	15
Monossacarídeos	2
Polifenóis (taninos)	4
Pectinas	2
Aminoácidos	0.1
Ceras e esteróides	Traços - 25
Cinzas/sais	8
Umidade	10
Celulose, etc.	43

Fonte: Almaguer *et al.* (2014).

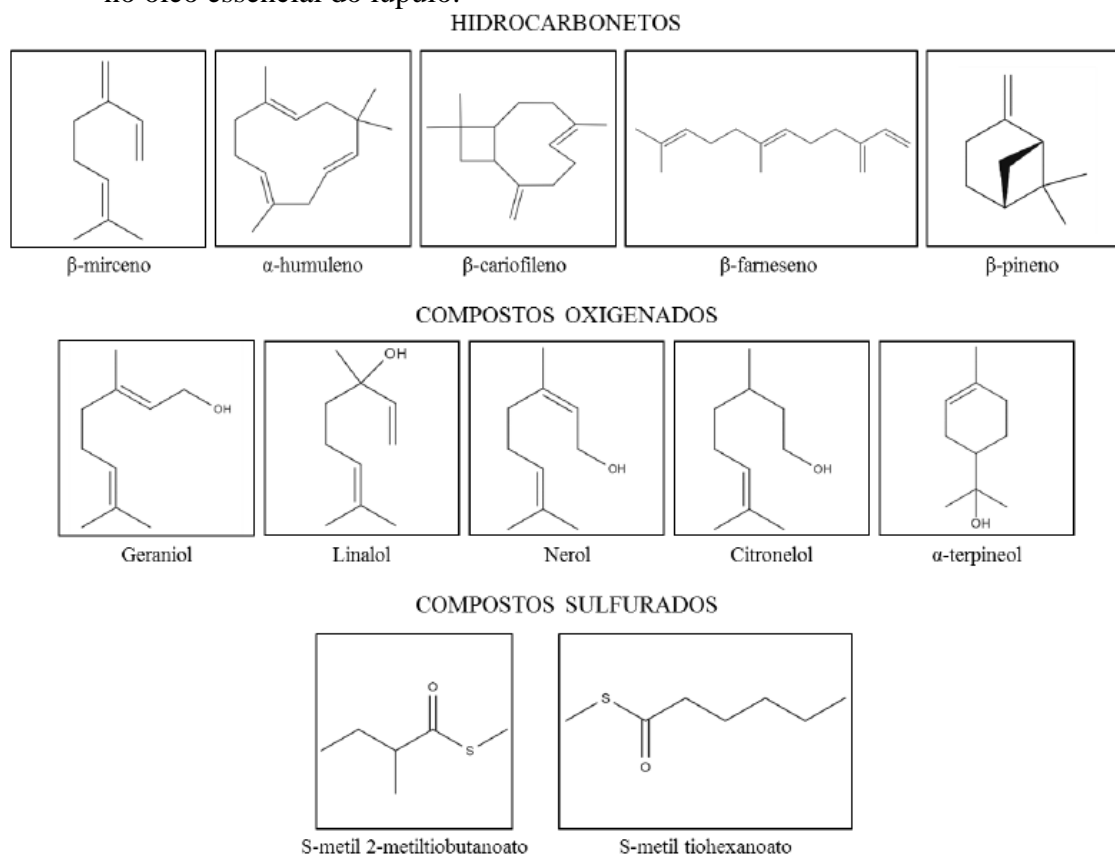
Salienta-se que determinados fatores como a espécie do lúpulo, a região e os métodos de cultivo, o grau de maturação no momento da colheita, além de condições pós-colheita como secagem, peletização e armazenamento podem acarretar a variações na fração dos constituintes evidenciados na Tabela 1 (DURELLO, 2019).

As resinas totais do lúpulo podem ser classificadas em resinas macias e resinas duras. Nas resinas macias, encontram-se os ácidos amargos do lúpulo constituídos de um conjunto de  $\alpha$ -ácidos (humulonas) e  $\beta$ -ácidos (lupulonas). Esses ácidos amargos são os mais relevantes para

a indústria cervejeira. Os  $\alpha$ -ácidos são os constituintes mais importantes das resinas totais, uma vez que contribuem para o amargor da cerveja devido a isomerização destes compostos (iso- $\alpha$ -ácido ou iso-humulonas) quando submetidos à etapa de fervura. Em respeito à fração  $\beta$ , dividida em  $\beta$ -ácidos e resinas macias não caracterizadas, destaca-se como principal composto as lupulonas, sendo estas também precursoras de compostos de amargor para a cerveja e responsáveis por ações antimicrobianas, colaborando para a estabilidade microbiológica da bebida (DURELLO, 2019; ALMAGUER *et al.*, 2014).

Conforme Almaguer *et al.* (2014), os óleos essenciais são definidos como metabólitos secundários secretados nas glândulas de lupulina da flor do lúpulo. A fração do óleo essencial equivale a 0,5-3% da massa total da flor seca do lúpulo e corresponde a parte volátil do material do lúpulo. Essa pequena fração volátil é constituída por mais de 200 compostos voláteis, sendo estes essenciais para conferir à cerveja aromas e sabores característicos de lúpulo. De forma convencional, os compostos presentes no óleo essencial do lúpulo são basicamente monoterpenos e sesquiterpenos, e podem ser classificados como hidrocarbonetos, compostos oxigenados e compostos contendo enxofre, sendo os mais comuns apresentados na Figura 2.

**Figura 2.** Estrutura química de hidrocarbonetos, compostos oxigenados e sulfurados presentes no óleo essencial do lúpulo.



Fonte: Fischer (2021) adaptado de Durello *et al.* (2019).

Os hidrocarbonetos abrangem os compostos voláteis (terpenos) mais importantes por constituir até 80% do óleo essencial de determinadas espécies, sendo esses os monoterpenos, como o  $\beta$ -mirceno e, sesquiterpenos como  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno e  $\beta$ -farneseno. Dentre esses, o  $\beta$ -mirceno possui uma fração essencial para o lúpulo por ser o principal a promover o aroma de lúpulo fresco, tendo seu aroma definido como resinoso, herbáceo, verde, balsâmico e fresco (LIGOR *et al.*, 2014). A concentração de  $\beta$ -mirceno diminui vigorosamente durante o armazenamento aeróbico do lúpulo e, principalmente, ao longo do processo de fermentação. Essa atenuação do mirceno ocorre devido sua volatilização e uma pequena parcela sofre autoxidação, dando origem a produtos de reação cíclicas, por exemplo o  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, canfeno e *p*-cimeno, além de formar terpenóides oxigenados como linalol, nerol, geraniol, citral,  $\alpha$ -terpineol ou carvona (RETTBERG *et al.*, 2018).

Quanto aos compostos oxigenados, estes são um conjunto muito complexo de álcoois, aldeídos, ácidos, cetonas, epóxidos e ésteres. O linalol é um dos compostos mais aromáticos presentes no óleo essencial do lúpulo, apresentando-se como uma substância primária para cervejas aromáticas, além de ser um álcool terpênico com aromas de frutas cítricas e de bergamota. Ademais, o linalol e o geraniol são compostos aromáticos que também contribuem para aromas florais (SHARPE E LAWS, 1981; EYRES E DUFOUR, 2009; ABERL E COELHAN, 2012).

O óleo essencial do lúpulo pode conter inúmeros compostos sulfurados (compostos que contêm enxofre), como, por exemplo, tioésteres, tiofenos, polissulfetos e tióis polifuncionais. Ao comparar com os terpenos e terpenóides, estes responsáveis por aromas positivos para a qualidade da cerveja, a maior parte dos compostos sulfurados apresentam características indesejáveis para a bebida. Os aromas atribuídos para alguns compostos contendo enxofre, a depender da estrutura química, possuem odores semelhantes aos de queijo, vegetais cozidos, queimados, mofados e borrachudos. Entretanto, essa classe de compostos pode apresentar alguns ésteres sulfanílicos, álcoois sulfurados e cetonas que evidenciam aromas frutados, cítricos, cassis, pêssego ou odores análogos aos de moscatel (RETTBERG *et al.*, 2018).

Na Tabela 2 observa-se, sucintamente, os aromas conferidos aos principais compostos do óleo essencial presente no lúpulo.

**Tabela 2.** Características aromáticas dos principais compostos presentes no óleo essencial do lúpulo.

<b>Compostos</b>	<b>Descrição de aromas</b>
$\beta$ -mirceno	herbáceo; resinoso; basâmico; fresco
$\alpha$ -mirceno	resinoso; pinho; ervas
$\alpha$ -humuleno	amadeirado/pinheiro; picante
$\beta$ -cariofileno	amadeirado; especiarias; picante
óxido de cariofileno	amadeirado; doce; frutado; herbal
$\beta$ -farneceno	floral; amadeirado; cítrico doce
$\alpha$ -pineno e $\beta$ -pineno	pinheiro; herbal; picante; pinho
$\beta$ -ionona	floral; frutado
$\beta$ -damascenona	frutado; mel
Linalol	floral; frutas cítricas; bergamota
Geraniol	floral; doce; rosa
Nerol	rosa; cítrico
$\alpha$ -terpinerol	anis; menta; gorduroso
$\beta$ -citronelol	fruta cítrica (limão/lima)
Epóxidos de humuleno	mofado; feno; cedro; artemisia
S-metil-2-metil tiobutanoato	Trufa
S-metil tiohexanoato	Abacaxi

Fonte: Adaptado de Hieronymus (2012); Eyres e Dufour (2009); Sharpe e Laws (1981).

Além das etapas obrigatórias de produção de cerveja, mencionadas no tópico anterior, podem ser efetuadas etapas adicionais e opcionais com o propósito de aperfeiçoar a aparência, conferir aromas característicos e certificar a qualidade e durabilidade da cerveja. Além disso, devido à alta volatilidade dos óleos essenciais presentes no lúpulo, é possível realizar uma etapa adicional de lupulagem, denominada *dry hopping* (DH), durante ou após a fermentação ou maturação da cerveja (GOMES *et al.*, 2021; MATOS, 2011).

O DH, também conhecido como lupulagem a frio, refere-se à adição de lúpulo ou produtos de lúpulo nos baldes de fermentação ou de maturação, de forma a ocorrer a extração a frio de compostos voláteis e não-voláteis de lúpulo em uma solução alcoólica. Essa técnica possibilita a retenção de compostos voláteis do lúpulo e da estabilidade de sabor da cerveja, também eleva a ação antioxidante na bebida, uma vez que, ao longo da fervura do lúpulo são perdidos por evaporação cerca de 90% dos compostos voláteis, enquanto outros compostos sofrem oxidação. Nos últimos anos, esse processo tem sido bastante difundido entre os cervejeiros artesanais e até nas grandes cervejarias. Além do mais, essa técnica é empregada em vários estilos de cervejas americanos, como *IPA*, *American Pale Ale*, *Imperial Stouts*, cervejas belgas como *Ales* e *Tripels*, cervejas britânicas tradicionais, como *IPA*, *Extra Special*

*Bitter* e em diversos estilos recentes no mundo (RETTBERG *et al.*, 2018; ROBERTS E FALCONER, 2018; HALEY E PEPPARD, 1983; KUNZ *et al.*, 2014).

A eficiência da técnica de DH depende de determinados fatores, tais como: quantidade de lúpulo; características do lúpulo (formas do lúpulo, densidade do *pellet*, óleo essencial); número de adições (única ou múltiplas); condição das glândulas de lupulina; temperatura (depende do estágio de adição, e.g., fermentação, maturação); contagem de cepa de leveduras e tempo de contato. Ao utilizar pellets ou lupulina em pó, é possível otimizar a extração, visto que ambas formas possuem a glândula de lupulina esmagada, aumentando a superfície de contato. Quanto a levedura, esta pode apresentar um impacto relevante na intensidade, caráter, qualidade e rendimento do aroma, sendo que a presença da levedura auxilia na liberação dos compostos aromáticos ligados por glicosídeos solúveis de lúpulos (GOMES *et al.*, 2021; ROBERTS E FALCONER, 2018).

De acordo com o local de adição de lúpulo, é viável empregar alguns métodos de DH para a lupulagem a frio no processo de fabricação de cerveja. Em relação aos óleos ou extratos de lúpulos, estes não demandam de métodos ou equipamentos específicos para a sua incorporação, sendo possível a aplicação direta à bebida. Nesta situação, geralmente, esses óleos ou extratos são utilizados após a filtração da cerveja ou um pouco antes do envase, maximizando a retenção do aroma (GOMES *et al.*, 2021).

Nas etapas de fermentação ou maturação, o lúpulo pode ser adicionado no recipiente de duas formas: por dissolução dos extratos de lúpulo e por meio de um *hop bag*. Quanto ao primeiro método, os extratos de lúpulo são dissolvidos em água e misturados à bebida ou dissolvidos na própria cerveja durante todo o processo de fermentação ou maturação. Em seguida, realiza-se a filtração do produto. Já no segundo método utiliza-se uma bolsa de voal (tecido delicado) ou um recipiente de tela metálica, mais conhecido pelo termo em inglês “*hop bag*”, sendo este preenchido por lúpulo e introduzido no tanque de fermentação ou maturação para o processo de lupulagem (HORNINK E GALEMBECK, 2019; HIERONYMUS, 2012). Por fim, o método de DH mais simples e empregado pela indústria cervejeira é o “tanque de circulação”, no qual após a adição dos extratos do lúpulo neste tanque ocorre a pressurização com dióxido de carbono e, logo depois, a cerveja passa pelo processo de recirculação dentro do mesmo recipiente por um tempo pré-estabelecido (ROBERTS E FALCONER, 2018).

### 3.4. Preparo de amostras

Os métodos analíticos, pertencentes a área da Química Analítica, dependem da qualidade de cada etapa envolvida no procedimento para que a aplicação da metodologia seja efetiva. Entre as variadas etapas vinculadas em uma análise química, destacam-se a amostragem, preparo de amostra, identificação e quantificação, processo de convalidação com verificação estatística e processo decisório. Neste cenário, têm-se os procedimentos de preparo de amostra como uma das etapas indispensáveis dos processos analíticos, em que visa reduzir as interferências e incompatibilidades das amostras com instrumentos analíticos que são capazes de comprometer a separação, seletividade e sensibilidade ao determinar quantitativamente várias espécies de interesse (VALENTE E AUGUSTO, 2000).

O preparo de amostra equivale à discriminação ou concentração dos analitos de uma matriz, posto que maior parte dos instrumentos analíticos não incluem um sistema totalmente automatizado para manipular e analisar os inúmeros tipos de amostras existentes. Em vista disso, esse processo pode promover tanto a limpeza (*clean up*) como também é capaz de possibilitar um relevante fator de enriquecimento dos compostos de interesse (BORGES *et al.*, 2015). As etapas que podem compor o preparo de amostra são: coleta, armazenagem, solubilização, extração, limpeza, pré-concentração, isolamento dos analitos e análise qualitativa e quantitativa. A extração e pré-concentração ainda são etapas delicadas em todo o procedimento analítico em razão das etapas serem lentas, propícias à contaminação e a perda das espécies em investigação no decorrer do manejo da amostra (CARASEK *et al.*, 2002).

As técnicas de extração e/ou pré-concentração são diversas e para a escolha de uma deve ser levado em consideração a natureza do analito e do tipo de matriz, a simplicidade da técnica, rapidez, custo, extratos parcialmente livres de interferentes, além de boa exatidão e precisão, sendo essas exemplificadas através da: extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*), extração com fluido supercrítico (SFE, do inglês *Supercritical Fluid Extraction*), extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*) e a microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Microextraction*) (JARDIM, 2010; QUEIROZ *et al.*, 2001).

Os métodos clássicos de processamento e ainda muito empregados, como a LLE, SPE e SFE, apresentam muitas etapas que estão sujeitas a perda de analitos e/ou contaminação, requerem grandes volumes de amostras e alto consumo de solventes orgânicos, além de possuírem um processo lento, trabalhoso e de difícil automação (BARRIONUEVO E LANÇAS, 2001).



Nesse contexto, as técnicas de microextração são priorizadas no intuito de conter as adversidades presentes nos processamentos clássicos de extração por meio de métodos otimizados que utilizam pequenos volumes de amostras, quantidade mínima ou livre de solventes orgânicos, sendo mais eficientes e sustentáveis, com maior seletividade e especificidade, rápidos, e de fácil automação (MARTINS *et al.*, 2012; VALENTE E AUGUSTO, 2000).

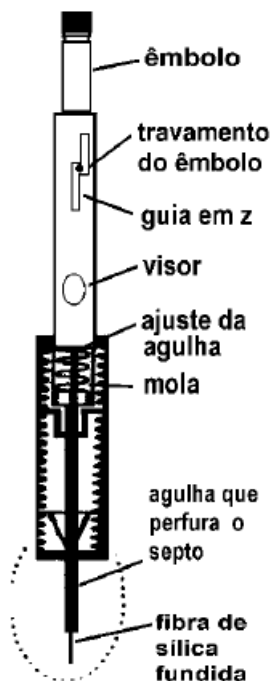
Dentre as técnicas de microextração existentes destaca-se a microextração em fase sólida (SPME) para a extração de compostos voláteis e semivoláteis. O princípio básico da SPME fundamenta-se na adsorção de analitos voláteis a uma fibra de sílica fundida revestida com algum sorvente (MATA *et al.*, 2004).

A SPME é classificada como uma microtécnica de extração que, em comparação aos métodos tradicionais de amostragem, não necessita de solvente, opera com menores volumes de amostra, tem elevado poder de concentração, é rápida, pode ser aplicada para variadas classes de analitos e apresenta pequena perda e contaminação da amostra no decurso do armazenamento e do transporte do material para o cromatógrafo (VALENTE E AUGUSTO, 2000; PARREIRA E CARDEAL, 2005). Sendo assim, a SPME corresponde a uma técnica miniaturizada que cumpre com os princípios da Química Verde, além de possuir vantagens como a associação da amostragem e pré-concentração dos analitos em uma única etapa e também viabilizar a dessorção direta no sistema cromatográfico (MENEZES, 2011).

Neste procedimento é utilizado um bastão de fibra ótica, de sílica fundida, revestida com uma fina película de um polímero ou de um adsorvente sólido (e.g., carvão ativado microparticulado). Este dispositivo equivale a uma microseringa reutilizável, em que a agulha da seringa é ajustada para envolver pedaços de fibra que, de acordo com o movimento do êmbolo, pode ser exposta ou retraída (BELTRAN *et al.*, 2000). A Figura 3 está representando um dispositivo de SPME. Inicialmente, essas fibras eram recobertas por polidimetilsiloxano (PDMS) e poliacrilato (PA), sendo as primeiras fibras de SPME produzidas. Na atualidade, encontra-se comercialmente diferentes revestimentos para as fibras, compreendendo uma vasta série de polaridades. Em relação a esses revestimentos, alguns exemplos de fibras que estão disponíveis são: não-polares de polidimetilsiloxano (PDMS), utilizadas basicamente para compostos apolares; fibras polares de poliacrilato (PA) e carbowax/divinilbenzeno (CW/DVB), indicadas para compostos voláteis de média e alta polaridade; fibras bipolares de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB) e polidimetilsiloxano/divinilbenzeno/carboxen (PDMS/DVB/CAR), para voláteis e não voláteis de baixa a alta polaridade, e polidimetilsiloxano-carboxen (Carboxen-PDMS), para compostos

voláteis (QUEIROZ *et al.*, 2001; VALENTE E AUGUSTO, 2000). A fase extratora é selecionada de acordo com as propriedades físico-químicas do soluto, especificamente: a polaridade, massa molar e volatilidade do soluto (QUEIROZ, 2009).

**Figura 3.** Dispositivo utilizado em micro extração em fase sólida (SPME).



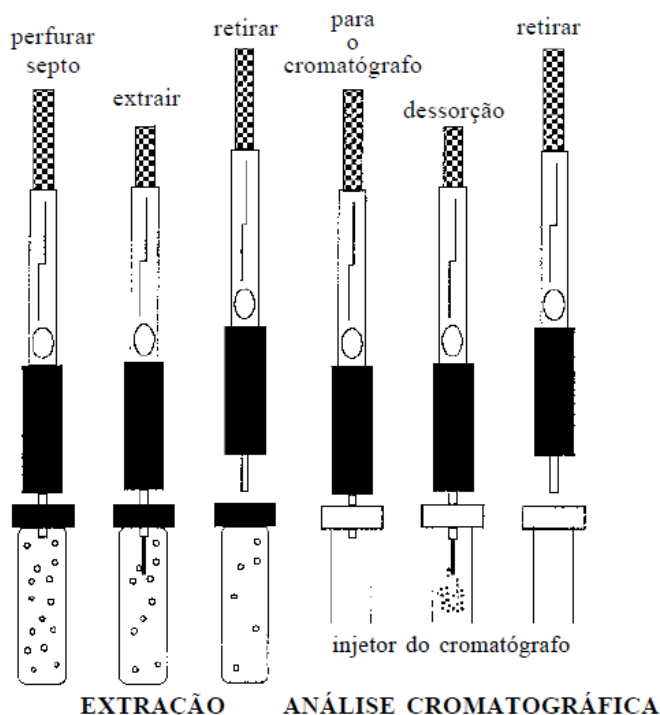
Fonte: Barrionuevo e Lanças (2001).

Os processos de extração podem ser de duas maneiras distintas, a depender da fibra de SPME empregada. Esses processos podem ser definidos como absorção e adsorção. Nas fibras absorventes, os analitos são extraídos no interior de uma fase aquosa pelo método de partição, sendo que este método se baseia na distribuição do analito até estabelecer uma relação de equilíbrio entre duas fases imiscíveis. O aumento da atração de um analito específico pode ocorrer de acordo com a polaridade da fibra, no entanto será a espessura da película líquida na fibra que irá retê-lo, dessa forma a quantidade de analitos retidos dependerá especialmente da espessura desse revestimento líquido e do tamanho do analito. Nas fibras adsorventes, os analitos são extraídos por interações físicas, ou seja, esses são retidos dentro dos poros internos presentes no revestimento da fibra. Para analitos pequenos e medianos utiliza-se os microporos e mesoporos, visto que os analitos geralmente permanecem retidos até a realização da dessorção térmica ou por solventes. Já os macroporos são ideais para grandes analitos, retidos por interações de Van der Waals ou ligações de hidrogênio. Entretanto nestas fibras acontece a

competição entre os analitos em razão de existir um número restrito de sítios de adsorção (PARREIRA E CARDEAL, 2005).

Para o uso dos dispositivos e fibras do sistema SPME, a extração e dessorção no injetor do cromatógrafo devem ocorrer com a fibra ainda recolhida na agulha, isso devido as fibras de sílica fundida serem extremamente frágeis e propícias a danificação em determinados procedimentos. O septo do frasco de amostra é então perfurado e a fibra é exposta à amostra. Ao finalizar a extração, a fibra é retraída novamente para o interior da agulha e é removida do septo. Em seguida, ocorre a inserção no cromatógrafo, através dos mesmos métodos realizados para a extração, havendo a dessorção térmica, separação e detecção dos analitos. Após esse processo, as fibras podem ser reutilizadas posteriormente em novas extrações (VALENTE E AUGUSTO, 2000; PARREIRA E CARDEAL, 2005). A Figura 4 ilustra os processos para a execução da extração e dessorção no injetor do sistema cromatográfico.

**Figura 4.** Processo de extração e dessorção dos analitos utilizando amostrador de SPME e GC.



Fonte: Valente e Augusto (2000).

A extração na SPME baseia-se no deslocamento das moléculas do analito presente na matriz para o revestimento da fibra até que se alcance um sistema trifásico próximo do equilíbrio, considerando a distribuição dos compostos pelas fases aquosa (amostra homogênea), polimérica (bastão de sílica fundida da fibra) e gasosa (*headspace* do frasco). Tudo isso

mediante o equilíbrio de partição do analito ou de adsorção entre a fibra e o meio que a engloba. Sendo assim, a teoria de SPME se fundamenta na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que explica o equilíbrio de partição do analito entre essas (QUEIROZ, 2019; VALENTE E AUGUSTO, 2000).

Há dois principais modos de extração em SPME: a extração direta e a extração indireta (via *headspace*, HS-SPME). Na extração direta, a fibra é imersa diretamente na amostra, assim, acontece o transporte dos analitos da matriz para o recobrimento da fibra. Este modo, adequado para analitos pouco voláteis, possui como desvantagem a grande chance de sorção de interferentes e de substâncias de elevada massa molar, tendo potencial de ocasionar o efeito de memória e/ou reduzir a vida útil da fibra. Já na HS-SPME a fibra é exposta à região gasosa sobre a amostra e a transferência dos analitos ocorre através da barreira de ar entre a amostra e a fibra. O modo indireto, indicado para analitos de média e alta volatilidade, é mais seletivo e fornece cromatogramas livres de interferentes, uma vez que é possível evitar danos na fibra provocados tanto pela dessorção ineficaz de compostos de elevada massa molecular ou baixa volatilidade, como também pela adição de reagentes as amostras no intuito de ajustar o pH ou a força iônica (VIEIRA *et al.*, 2012; BATISTA, 2010).

A técnica de SPME apresenta fatores que influenciam a eficiência da extração de analitos. Tais fatores são descritos como a força iônica, pH, agitação, temperatura de extração e tipo de fibra. Com relação a força iônica, a adição de um eletrólito forte à amostra diminui a solubilidade de compostos de baixa polaridade, favorecendo a transferência dos mesmos para a fase vapor e/ou para a fibra causando um aumento significativo na eficiência de extração. Porém, no caso de compostos muito polares e/ou ionizados, a adição de eletrólitos pode ser inadequada, visto que a ação destes na solução aumenta com a força iônica. A adição de sais solúveis à solução, como NaCl, aumenta a força iônica da amostra. Dessa maneira, ocorre a minimização da solubilidade de compostos orgânicos, o que facilita a transferências de analitos da amostra para o *headspace* e o transporte desses para a fibra, causando um efeito positivo sobre a extração (POLO *et al.*, 2005).

A influência do pH na extração é determinada por meio dos analitos básicos ou ácidos. A extração de substâncias ácidas é mais favorável em pH baixos, ao mesmo tempo que as substâncias básicas são melhores extraídas em pH altos. Nas amostras ácidas os analitos básicos permanecerão ionizados, minimizando sua volatilidade e a afinidade com a fibra. O efeito contrário também ocorre para amostras básicas, no qual os analitos ácidos estão ionizados. A agitação da amostra afeta diretamente no tempo de extração, dado que essa favorece a difusão dos analitos na amostra, assim, acelera a transferência de massa entre as fases e, em

consequência, o tempo de extração é minimizado. Quanto a realização de extrações por via *headspace*, a temperatura de extração é extremamente importante para a eficiência do processo, isso devido ao aumento da temperatura provocar o aumento da pressão de vapor dos analitos, levando estes facilmente à fase de vapor e contribuindo para o equilíbrio com a fibra. Em contrapartida, altas temperaturas diminuem a constante de equilíbrio dos analitos entre a fase gasosa e polimérica, minimizando a extração de compostos leves e facilitando a extração de compostos pesados. Por fim, a eficiência da extração depende do tipo de revestimento na fibra, uma vez que a fibra e a matriz competem pelos analitos, dessa forma, a fibra necessita possuir maior afinidade aos analitos do que a fase aquosa (KOMATSU E VAZ, 2004; BATISTA, 2010).

A SPME é um método bem estabelecido e tem sido empregado frequentemente em associação com cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). Diversos artigos vêm sendo publicados mencionando a aplicação destas técnicas em amostras de cerveja para análise de diferentes analitos, como HPAs, nitro-HPAs e oxi-HPAs pertencentes a classe de contaminantes (DOS SANTOS *et al.*, 2021), aldeídos presentes no envelhecimento de cervejas (DENNENLÖHR *et al.*, 2020a), compostos com enxofre/tióis (DENNENLÖHR *et al.*, 2020b), compostos de aroma originados do lúpulo (DENNENLÖHR *et al.*, 2020c), compostos voláteis de sabor (VIEIRA *et al.*, 2020), compostos voláteis alterados com o DH (CEOLA *et al.*, 2019).

### **3.5. Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)**

A cromatografia é um dos métodos modernos de análise de maior uso. A aplicação dessa técnica viabiliza a separação, identificação e quantificação de espécies químicas em misturas complexas (LANÇAS E MCNAIR, 1983).

A cromatografia gasosa consiste no transporte dos compostos de uma mistura através da fase estacionária pela corrente da fase móvel, no qual as separações dependem das migrações diferenciais destes compostos (SKOOG *et al.*, 2006).

Entre os métodos de separação cromatográficas, a cromatografia a gás (GC; *Gas Chromatography*) é uma das mais aplicadas em análises qualitativas e quantitativas. Quando introduzida no sistema de injeção, a amostra é vaporizada e os analitos presentes nesta são separados tanto conforme o coeficiente de partição entre a fase móvel gasosa e a fase estacionária (líquida ou sólida) contida no interior da coluna quanto pelas distinções das pressões de vapor desses componentes (SKOOG *et al.*, 2006).

A fase móvel possui o encargo de transportar o analito ao longo da coluna cromatográfica por meio de um gás de arraste (He, N<sub>2</sub>, Ar ou H<sub>2</sub>) inerte, ou seja, este não interage com as moléculas do analito. Dessa forma, o fluxo de gás (fase móvel) provoca a eluição dos compostos que quando separados percorrem pelo detector (HARRIS, 2012).

Quanto à fase estacionária em GC, pode-se dividir em dois tipos: cromatografia líquido-gás (GLC, do inglês *Gas-Liquid Chromatography*) e cromatografia sólido-gás (GSC, do inglês *Gas-Solid Chromatography*). Na cromatografia líquido-gás, a fase estacionária é uma película de polímero líquido de alta viscosidade retido sobre um sólido inerte por adsorção ou interação química. Já a cromatografia sólido-gás apresenta a fase estacionária como um sólido de grande área superficial que retém os analitos por adsorção física, sendo que essa é, em geral, adotada para separação de gases como nitrogênio, oxigênio, monóxido de carbono e outros. (SKOOG *et al.*, 2006; LANÇAS E MCNAIR, 1983).

Durante a análise, para que haja uma pressão de vapor que viabilize a eluição dos analitos em um intervalo satisfatório, deve-se manter a coluna cromatográfica aquecida de maneira constante ou programada, sendo que a programação de temperatura da coluna consiste no aumento da temperatura de modo linear ou em etapas no decorrer da separação. Na GC, programar a temperatura possibilita a melhoria da separação dos componentes da amostra e minimiza o tempo total de análise. Para isso, faz-se necessário abrigar a coluna em um forno termostaticado (COLLINS *et al.*, 1997).

Em análises por GC, normalmente utiliza-se colunas capilares muito finas, com diâmetros internos entre 0,15 e 0,75 mm e extensão de 10 a 100 m, produzidas de sílica fundida (SiO<sub>2</sub>), uma vez que esse material é puro, extremamente inerte e gera colunas moldáveis. As colunas capilares também são revestidas com poli-imida, um polímero apropriado para uso em elevadas temperaturas e que auxilia na preservação da coluna. Tais colunas apresentam vantagens, quando comparadas às colunas empacotadas, como: menor tempo de análise, maior resolução e maior sensibilidade. Em casos de instabilidade química, as colunas capilares podem sofrer decomposição em razão de altas temperaturas e por impurezas presentes no gás de arraste, conseqüentemente, produtos podem ser levados para fora da coluna, além de causar alterações nas propriedades de retenção (COLLINS *et al.*, 1997; HARRIS, 2012).

Por meio de um registrador gráfico, adquire-se resultados de uma análise por GC. Tal registro gráfico, denominado como cromatograma, exhibe os picos de compostos de uma amostra e a intensidade de concentração em que esses apresentam-se em um tempo específico. Nesse contexto, é possível obter informações com base em dois critérios indispensáveis: o *tempo de retenção* e a *área* do pico. A concentração de cada composto separado na coluna cromatográfica

é estabelecido pela área do pico, enquanto o tempo de retenção ( $t_r$ ) é o tempo necessário, a partir do momento da injeção da amostra, para a obtenção de um pico do soluto no detector. Em condições rigorosamente controladas e na mesma coluna, os compostos terão o mesmo tempo de retenção, assim, facilita a identificação dos picos, uma vez que estes são reproduzidos (LANÇAS E MCNAIR, 1983).

No que se refere ao índice de retenção (IR) de um componente, que é tabelado para cada analito em determinadas condições de análise por GC e pode ser usado para identificação de compostos, ele é obtido pela associação do tempo de retenção do componente em investigação com o tempo de retenção de dois padrões (em geral hidrocarbonetos) eluídos anteriormente e posteriormente ao composto de relevância. Ainda que as bibliotecas de espectro de massas se apresentem como uma poderosa ferramenta em análise qualitativa, elas podem não ser completas ou suficientes para verificar integralmente certos compostos. Dessa forma, os cálculos de Índices de Retenção por Programação de Temperatura (LTPIR, do inglês, *Linear Temperature Programmed Retention Index*) dos compostos são uma alternativa para evitar identificações incorretas (AKIYAMA *et al.*, 2003; VIEGAS E BASSOLI, 2007). O LTPRI é um valor calculado usando os números extraídos dos algoritmos na ocasião em que empregam temperaturas programadas de coluna (VIEGAS E BASSOLI, 2007; IRVING *et al.*, 1977).

O emprego de equipamentos de detecção em separações cromatográficas a gás gera uma ferramenta analítica poderosa e eficaz para uma identificação e quantificação seletiva ou de variadas classes de compostos. Tal situação pode ser exemplificada através da associação do cromatógrafo a gás (GC) ao espectrômetro de massas (MS), esta combinação é conhecida como cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) (SKOOG *et al.*, 2006).

A espectrometria de massas se fundamenta na quebra das ligações químicas das moléculas da amostra e na formação de íons em fase gasosa por meio de fontes de ionização energética. Esses íons percorrem por um analisador de massas, onde são selecionados em razão da massa/carga ( $m/z$ ) e detectados, assim, fornecendo um espectro de massas que apresenta, na forma de um gráfico, a intensidade do sinal produzido pelo íon *versus*  $m/z$ . A soma dos inúmeros íons em cada espectro podem ser empregues em um outro gráfico em função do tempo, gerando um cromatograma de íons totais (SKOOG *et al.*, 2006).

O modo de operação do analisador de massas é um importante parâmetro para a espectrometria de massas. Entre os modos existentes, o modo *scan* realiza a coleta de dados sobre uma extensa faixa de massas que engloba todos os íons moleculares e fragmentados produzidos, além de que este modo fornece o máximo de informação qualitativa de um determinado composto. No modo SIM (monitoramento seletivo de íon, do inglês *Select Ion*

*Monitoring*), o analisador de massas pode ser programado para monitorar somente valores de  $m/z$  selecionados e aumentando a sensibilidade. Neste modo, é possível obter as melhores informações quantitativas dos compostos alvos (BECKER, 2012).

Recentemente, a SPME e a GC-MS têm sido empregada como preferência em análises de compostos voláteis em alimentos, incluindo cerveja. Para a Indústria Cervejeira, ambos os métodos apresentam-se precisos, seletivos e possibilitam a identificação de compostos voláteis de interesse em diferentes estilos de cerveja. Através dessas técnicas, faz-se a aplicação dos princípios da Química Verde ao eliminar o uso de solventes orgânicos que podem ser tóxicos, além de viabilizar que inúmeras amostras sejam processadas, entretanto obtém-se uma grande quantidade de dados que requerem procedimentos de interpretação como ferramentas quimiométricas (ALVIM *et al.*, 2017).

### 3.6. Quimiometria

Em uma investigação científica prática, as informações extraídas dos resultados implicam na análise de um extenso número de variáveis, sendo que destas variáveis somente uma minoria será capaz de conceder informações químicas relevantes, enquanto a maior parte delas acrescentam informações insuficientes ou nenhuma à compreensão dos resultados (NETO E MOITA, 1998). Nesse contexto, se faz indispensável o uso de ferramentas avançadas de análise para melhor visualização e interpretação dos resultados de sistemas complexos.

A quimiometria é uma área interdisciplinar, englobando estatística multivariada, matemática, ciência da computação e química analítica, que aplica métodos matemático-estatísticos para preparar ou separar experimentos de modo otimizado e extrair o máximo de informações químicas com a análise dos dados obtidos, concedendo-os de maneira simplificada (GEMPENLINE, 2006; FERREIRA *et al.*, 1999). Os primeiros conceitos sobre quimiometria foram apresentados na primeira metade da década de 70 como consequência de sucessivos avanços nos instrumentos e nos microcomputadores (NETO *et al.*, 2006). Embora a quimiometria tenha iniciado somente como um método de classificação química, na atualidade já é possível dividi-la em três áreas fundamentais: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões e calibração multivariada (PEREIRA *et al.*, 2014).

A área de planejamento e otimização de experimentos auxilia na minimização da realização de experimentos e no gasto de reagentes, sendo ela responsável por examinar os efeitos de variáveis sobre resultados analíticos e especificar quais dessas são mais relevantes. O reconhecimento de padrões é a área que analisa extensos volumes de dados de um conjunto



de amostras para identificar similaridades entre elas e, assim, formar agrupamentos que irão definir tendências. Por último, a área de calibração multivariada relaciona um conjunto de padrões com as variáveis físico-químicas de interesse, visando estabelecer a concentração de uma determinada espécie (PEREIRA *et al.*, 2014).

A análise multivariada, caracterizada pelos modelos estatísticos e quimiométricos, aplica métodos matemáticos a fim de correlacionar inúmeras amostras analisadas ao mesmo tempo para a extração significativa de informação. Dessa forma, se faz necessário a simplificação dos dados, sendo estes reunidos em uma matriz  $X$  ( $m \times n$ ), no qual  $m$  representa as amostras e  $n$  são as variáveis. Neste cenário, evidentemente, os cromatogramas estão sobrepostos em uma única matriz (GEMPENLINE, 2006). O algoritmo COW (do inglês, *Correlation Optimized Warping*) executa o alinhamento por meio da divisão do cromatograma em diversos segmentos que sofrem deformações lineares (sendo esticados ou contraídos), em conciliação com interpolações, otimizando os coeficientes de correlação entre os segmentos proporcionais aos cromatogramas de referência e de amostra (NIELSEN *et al.*, 1998; SOUZA, 2010).

No que se refere a conjuntos de dados multivariados, a Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA) é um método que visa a redução da dimensionalidade do sistema de dados, mantendo o máximo de informação estatística por meio da construção de gráficos bi ou tridimensionais. Na PCA os modelos multivariados são desenvolvidos utilizando vetores de base ortogonal, normalmente designados de componentes principais (PCs). Tais PCs são as combinações lineares das variáveis originais, no qual se apresentam ordenadas em ordem decrescente de máxima variância (CORREIA E FERREIRA, 2007; GEMPENLINE, 2006).

Dentre os princípios da PCA evidenciam-se a correlação entre amostras e a caracterização delas conforme suas similaridades, possibilitando a detecção de amostras anômalas. A PCA decompõe a matriz original de dados em uma soma de matrizes, que são resultados dos vetores de *scores* (T) e *loadings* (P), sendo que o vetor de *score* indica associações entre as amostras, enquanto o vetor de *loadings*, a relação entre as variáveis (BERNARDES, 2015). Ademais, por meio dessa técnica pode-se avaliar a relevância das respectivas variáveis originais, isto é, na combinação linear dos primeiros PCs as variáveis originais de peso (*loadings*) superior são as de maior importância da perspectiva estatística. Em conclusão, o químico que atua na área de análises multivariadas possui o dever de interpretar o arranjo dos pontos no gráfico de PCs e de determinar as variáveis originais com maior peso na combinação linear das componentes principais de interesse (NETO E MOITA, 1998).

Mediante o exposto, a técnica HS-SPME aliada ao GC-MS para a extração e análise de compostos, podem ser utilizadas para as análises de cerveja, visando identificar compostos voláteis e semivoláteis no decorrer do processo de DH. Através da aplicação de métodos quimiométricos, pode-se realizar uma avaliação dos dados obtidos para a melhor interpretação dos resultados.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

- Balança analítica modelo AY220 da *Shimadzu* (Quioto, Japão);
- Cloreto de sódio, NaCl, de grau P.A. adquirido de *Synth* – (Diadema, São Paulo, Brasil);
- Fibras comerciais para SPME de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno/carboxen (PDMS/DVB/CAR) adquiridos da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).
- Vials de 20 mL de vidro incolor com tampa de rosca constituída de alumínio e septo de silicone e teflon;
- Frascos âmbar de vidro de 50 mL com septos de silicone e tampa de rosca;
- Pipeta de 5 mL e pêra de sucção.

### 4.2. Amostras

Doze amostras referentes à cerveja *American Pale Ale* (APA) foram obtidas com um produtor caseiro local de cerveja artesanal. A primeira coleta ocorreu no último dia de fermentação (coleta inicial), antes de dar início ao processo de DH, quando foram adicionados 125 g do lúpulo *Amarillo*, em *pellets*, para 25 L de cerveja, o que resulta numa proporção de 5 gL<sup>-1</sup>. As demais amostras foram coletadas, de dois em dois dias, ao longo de 10 dias do processo de DH durante a maturação da cerveja. Todas as coletas foram realizadas em duplicatas e diretamente do tanque de produção, as quais foram armazenadas em frascos âmbar de vidro com septos de silicone e mantidas em temperatura inferior à 4°C até o momento da análise. Ao final da última coleta, as amostras foram imediatamente analisadas. Na Tabela 3 estão indicados o período de DH em que cada amostra foi coletada.

**Tabela 3.** Amostras de cerveja coletadas em função do tempo de DH.

<b>Amostra</b>	<b>Dia do processo de <i>dry hopping</i></b>
<b>1</b>	Coleta inicial
<b>2</b>	Coleta inicial
<b>3</b>	Primeiro dia de DH
<b>4</b>	Primeiro dia de DH
<b>5</b>	Terceiro dia de DH
<b>6</b>	Terceiro dia de DH
<b>7</b>	Quinto dia de DH
<b>8</b>	Quinto dia de DH
<b>9</b>	Sétimo dia de DH
<b>10</b>	Sétimo dia de DH
<b>11</b>	Décimo dia de DH
<b>12</b>	Décimo dia de DH

Fonte: Do autor (2021).

### 4.3. Preparo e análises de amostras

Um volume de 5 mL de cerveja foi retirado de cada frasco de armazenagem com o auxílio de uma pipeta e transferido para um vial de vidro específico para extração por SPME através do *headspace*. Previamente à extração, foram adicionados 1 g de NaCl em cada vial.

A extração dos compostos foi realizada com uma fibra de PDMS/DVB/CAR a uma temperatura de 35°C por 40 minutos. Para a dessorção dos voláteis retidos na fibra, utilizou-se um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS) *Shimadzu* QP-2010 Plus equipado com um sistema para injeções automáticas de SPME *Shimadzu* AOC-5000 auto injector, disponível no Centro de Análises e Prospecção Química (CAPQ/DQI/UFLA).

A dessorção da fibra no injetor ocorreu no modo *splitless* a 250°C durante um minuto. A fase estacionária da coluna foi gás hélio à 1 mL/min. Em relação a programação da temperatura do forno cromatográfico, a temperatura inicial foi de 40°C, aumentando 3°C/min até 160°C, em seguida, ocorreu um acréscimo de 20°C/min até 260°C, mantendo constante por 2 minutos. Totalizou-se 47 minutos de corrida.

O espectrômetro de massas foi configurado para realizar o monitoramento no modo *scan* na faixa de 40 e 350 m/z, 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.

#### 4.4. Identificação dos compostos

A identificação dos compostos existentes nas amostras previamente separados por GC-MS foi executada com o auxílio do *software* AMDIS<sup>®</sup> (do inglês, *Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System*), comparando os espectros de massas obtidos com os espectros disponibilizados na biblioteca NIST (do inglês, *National Institute of Standards and Technology*). Foram admitidos apenas os picos que apresentavam similaridade entre os espectros de massas maior ou igual a 80%.

Para os cálculos de índices de retenção linear experimental utilizou-se uma mistura padrão de n-alcenos (Sigma-Aldrich C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>). O padrão desses alcanos foi injetado no sistema GC-MS nas mesmas condições das análises das amostras.

Os Índices de Retenção com Programação Linear de Temperatura (LTPRI), apresentado por Van den Dool e Kratz em 1963 (MÜHLEN, 2009), podem ser calculados por meio da Equação 1:

$$LTPRI = 100n + 100 \frac{t_{R(i)} - t_{R(n)}}{t_{R(n+1)} - t_{R(n)}} \quad (1)$$

No qual  $t'_R$  equivale ao tempo de retenção ajustado (tempo de retenção do pico menos o tempo de eluição do pico de um composto não retido pela coluna cromatográfica).

$i$  – analito

$n$  – número de carbonos do padrão vizinho menos retido, e  $n + 1$  é o número de carbonos do padrão vizinho mais retido.

Os índices de retenção experimental calculados foram comparados aos índices de retenção teóricos acessíveis na literatura por Adams (2007) e foram adotados desvios de mais ou menos 10 unidades.

#### 4.5. Emprego dos modelos quimiométricos

Os doze cromatogramas em formato *net.cdf* foram exportados para o *software* MATLAB<sup>®</sup> (*The Mathworks Inc.*), onde extraiu-se os cromatogramas de íons totais. Em seguida, os cromatogramas de íons totais foram sobrepostos obtendo uma matriz 12x8000 contendo os 12 cromatogramas sobrepostos. Com a finalidade de favorecer a aplicação dos modelos quimiométricos, os cromatogramas nessa matriz foram alinhados em relação a um

cromatograma de referência utilizando a função COW, cujos parâmetros foram: o tamanho do segmento (**Seg**) dado como 400, e o **Slack**, relacionado com a deformação, para o qual utilizou-se 50, uma matriz de referência **T** escolhida de forma aleatória, e o parâmetro **X**, que consistiu em uma matriz que abrangia todos os cromatogramas sobrepostos.

A PCA foi efetuada empregando o cromatograma contendo todas as amostras sobrepostas e alinhadas usando o *software* Chemoface<sup>®</sup>, a partir do qual foram obtidos os gráficos de *scores* e *loadings*.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Identificação da fração volátil

As extrações por HS-SPME e subsequentes análises por GC-MS com programação linear de temperatura, proporcionaram a identificação de diversos compostos voláteis presentes nas amostras de cervejas artesanais do estilo APA ao longo do processo de DH, conforme apresentado pela Tabela 4.

Na Tabela 4 é possível observar informações dos compostos numerados de acordo com a retenção no cromatograma, como o nome dos compostos, o tempo de retenção (minutos), os índices de retenção (IR) teóricos e experimentais.

**Tabela 4:** Compostos identificados nas amostras de cervejas empregadas no estudo. (continua)

Picos	Nome	Tempo de retenção	IR Experimental	IR Teórico
1	Acetato de etila	2,86	609	606
2	2-metil-1-propanol	3,02	623	650
3	Acetato de N-propila	4,03	709	712
4	1,1-Dietoxietano	4,32	722	727
5	3-metil-1-butanol	4,48	730	734
6	2-metil-1-butanol	4,64	738	739
7	Acetato de 2-metilpropila	5,27	767	767
8	Butanoato de etila	5,97	800	802
9	Acetato de 3-metil-1-butanol	8,57	876	877
10	2-metil propanoato de 2-metilpropila	9,96	913	911
11	$\beta$ -Pinoeno*	12,75	974	974
12	$\beta$ -mirceno*	13,38	988	988
13	Hexanoato de etila	13,79	997	996
14	Isobutirato de isopentila	14,37	1009	1007
15	Isobutirato de 2-metilbutila	14,54	1013	1014
16	4-metila-hexanoato de metila	15,04	1023	-
17	5-metilexanoato de etila	16,71	1058	-
18	1-octanol	17,25	1069	1063
19	Heptanoato de etila	18,47	1095	1097
20	Linalol*	18,60	1097	1095
21	n-Amilisovalerato	18,98	1105	-

Legenda: \* Compostos que possuem relação direta com o lúpulo.

Fonte: Do autor (2021).

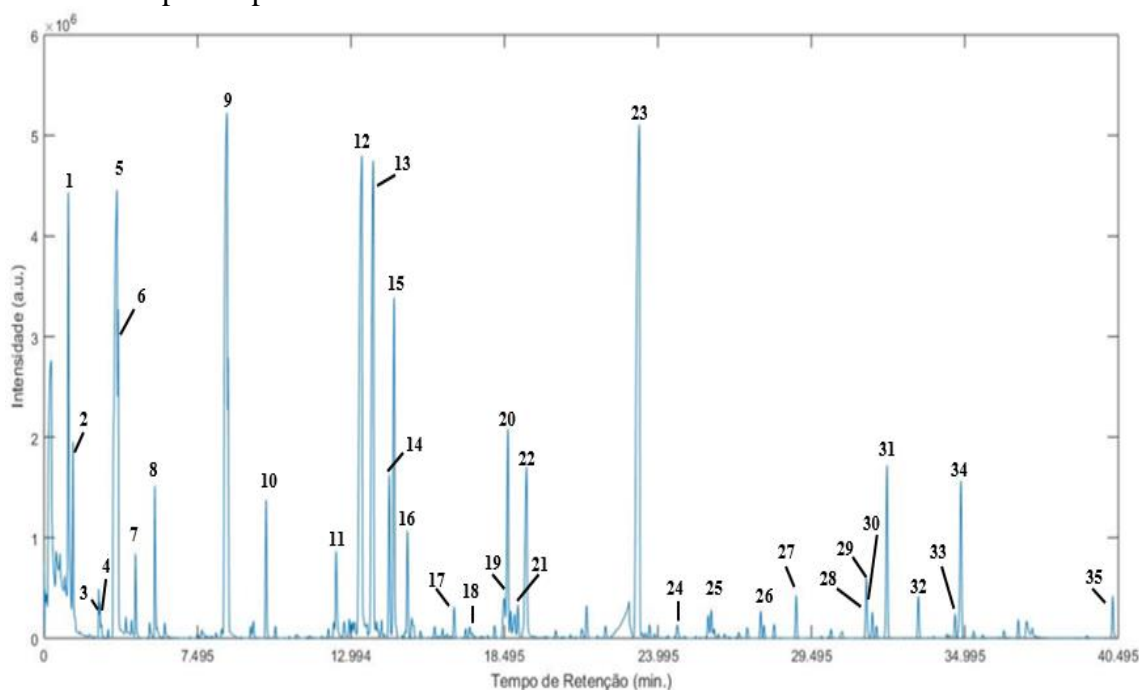
**Tabela 4:** Compostos identificados nas amostras de cervejas empregadas no estudo. (conclusão)

Picos	Nome	Tempo de retenção	IR Experimental	IR Teórico
22	Álcool fenetílico	19,28	1111	1107
23	Octanoato de etila	23,32	1194	1196
24	$\beta$ -citronelol*	24,69	1222	1228
25	Geraniol*	25,80	1246	1249
26	Nonanoato de etila	27,79	1288	1297
27	Geranato de metila	28,95	1315	1322
28	(Z) 4-Decenoato de etila	31,46	1375	-
29	Acetato de Geraniol*	31,47	1375	1383
30	Acetato de Nerol*	31,49	1375	1365
31	Decanoato de etila	32,20	1392	1395
32	Cariofileno*	33,33	1420	1442
33	Farneseno*	34,65	1452	1442
34	$\alpha$ -humuleno*	34,85	1457	1454
35	Dodecanoato de etila	40,31	1594	1595

Legenda: \* Compostos que possuem relação direta com o lúpulo.

Fonte: Do autor (2021).

A Figura 5 exibe um cromatograma típico da análise em questão, referente ao terceiro dia de DH, utilizado para a identificação dos compostos, os quais estão apresentados na Tabela 4.

**Figura 5.** Cromatograma referente a amostra do terceiro dia de DH com a identificação dos compostos presentes na Tabela 4.

Fonte: Do autor (2021).



A observação dos compostos identificados e exibidos na Tabela 4 reforça o fato de que a fermentação e a maturação são algumas das etapas mais importantes para definir aromas e sabores à cerveja, tendo um grande impacto nas características sensoriais. Isto procede em razão de que durante a fermentação, as leveduras consomem os açúcares fermentáveis, resultando na produção de etanol e CO<sub>2</sub>, além de subprodutos como ésteres (acetato de isoamila, hexanoato de etila, octanoato de etila), ácidos (acético, propiônico) e, como produtos secundários os álcoois superiores (álcool fenético, 3-metil-1-butanol). (ALVES *et al.*, 2020; KUCHARCZYK E TUSZYŃSKI, 2015).

A princípio, a identificação de compostos apresentou um elevado número de substâncias voláteis presentes nas amostras de cerveja características das classes de ésteres, álcoois, terpenos. Os ésteres e álcoois, originados pela levedura, pertencem aos grupos de compostos tidos como desejáveis nas bebidas alcoólicas, uma vez que conferem aromas específicos para cada estilo de cerveja, contribuindo para a qualidade sensorial da bebida. O acetato de etila é o principal éster detectado em bebidas alcoólicas e concedendo a estas o aroma “frutado” e “doce”. Outros ésteres também possuem uma grande relevância, como o acetato de isoamila (aroma de banana), acetato de isobutila (frutado), hexanoato de etila (aroma de maçã), octanoato de etila (aroma de maçã, frutas) (PIRES *et al.*, 2004; NORDSTROM, 1962).

O lúpulo *Amarillo*, empregado no DH das amostras de cerveja desse trabalho, tem características excepcionais de aroma com notas cítricas, pinho, gramíneo e de frutas tropicais. Esse tipo de lúpulo possui 7 – 11% de teor de  $\alpha$ -ácidos e concentração de óleo essencial de 1 - 2,3 mL em 100 g. Considerando a composição do óleo essencial do *Amarillo*, destaca-se os compostos: Mirceno (40-50%), Humuleno (19-24%), Cariofileno (7-10%), Farneseno (0-1%).

Diante disso, compostos voláteis presentes no óleo essencial do lúpulo, especificamente no lúpulo *Amarillo*, foram identificados ao longo das análises, por exemplo o  $\beta$ -mirceno (12), linalol (20),  $\beta$ -citronelol (24), geraniol (25), cariofileno (32), farneseno (33),  $\alpha$ -humuleno (34),  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno (11), acetato de geraniol (29), acetato de nerol (30), geranato de metila (27), sendo que alguns desses são extraídos direto do lúpulo, enquanto outros são obtidos a partir de reações secundárias e de oxidação dos compostos presentes no lúpulo. Estes compostos podem ser intensificados durante o processo de DH, sendo essenciais para conferir à cerveja aromas e sabores característicos, influenciando na qualidade final da cerveja (ALMAGUER *et al.*, 2014).

Para analisar a variação desses compostos relacionados ao lúpulo ao longo do processo de DH, optou-se por avaliar todos os compostos presentes nas amostras, e não apenas aqueles presentes originalmente no lúpulo, uma vez que processos enzimáticos e de oxidação podem transformar os terpenos do lúpulo em outros compostos.

## 5.2. Análises Quimiométricas

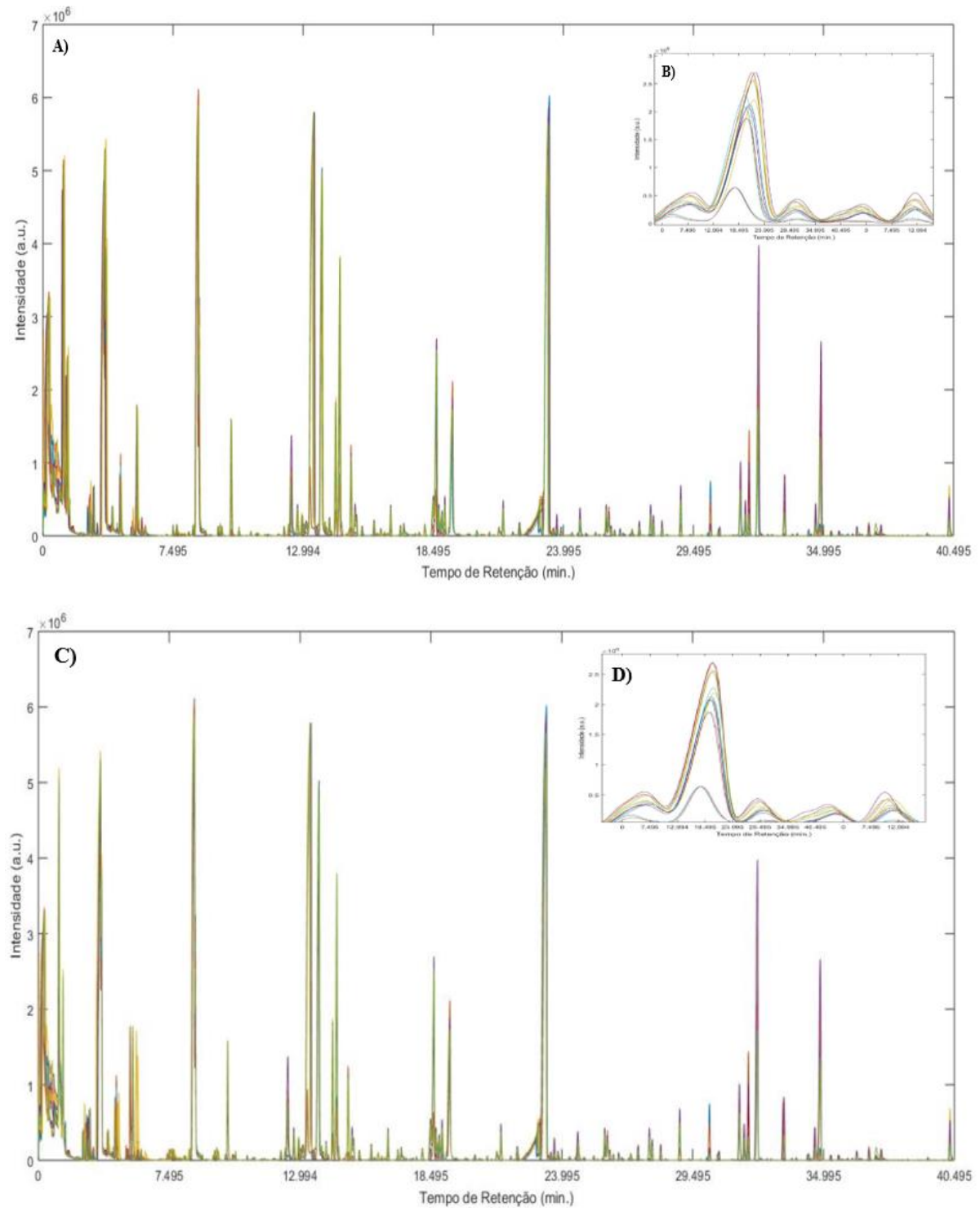
Na literatura existem mais de 200 compostos químicos distintos determinados nos óleos essenciais do lúpulo por GC-MS (ALMAGUER *et al.*, 2014). Nesse contexto, com o propósito da identificação de quais compostos variam ao longo do processo de DH, foi fundamental utilizar a análise quimiométrica, visto que a inspeção visual pode ser julgada como uma ferramenta inadequada, e a determinação da área de picos específicos de compostos presentes no lúpulo podem esconder outras informações importantes ou reações paralelas.

Em análises cromatográficas é natural que ocorra variação no tempo de retenção de um mesmo composto em várias análises, o que fica bastante evidente quando se faz a sobreposição dos cromatogramas em uma única matriz. Nesta circunstância, é indispensável o alinhamento temporal destes cromatogramas dado que este processo tem como objetivo o favorecimento da aplicação dos modelos quimiométricos. Diferenças nos tempos de retenção de picos equivalentes em diversas amostras provocam certos erros nas análises quimiométricas quando cada cromatograma é usado como um vetor, e o conjunto de cromatogramas é uma matriz de dado. Como resultado desse desalinhamento, é possível que nos *loadings* de uma PCA um mesmo composto possa ser interpretado como dois compostos diferentes e, dessa forma, concluir que existem diferenças nas amostras, quando na realidade ocorre apenas a necessidade de alinhamento temporal desses picos na matriz de dados.

Destaca-se que todos os cromatogramas utilizados nas análises quimiométricas foram cortados até 7000 pontos, uma vez que foi identificado diferenças nos finais dos cromatogramas devido a compostos da própria coluna cromatográfica, podendo acarretar em erros de análise.

Na Figura 6 é possível observar os cromatogramas sobrepostos de todas as amostras (Figura 6.A) e um corte (Figura 6.B) mostrando como os picos encontram-se desalinhados, enquanto nas Figura 6.C e 6.D é possível verificar esses cromatogramas alinhados após o uso do algoritmo COW. Após o alinhamento, os cromatogramas foram submetidos a análises quimiométricas exploratórias.

**Figura 6.** (A) Cromatogramas sobrepostos em uma matriz e desalinhados; (B) Fragmento dos cromatogramas sobrepostos em uma matriz e desalinhados; (C) Cromatogramas sobrepostos em uma matriz e alinhados; (D) Fragmento dos cromatogramas sobrepostos em uma matriz e alinhados.

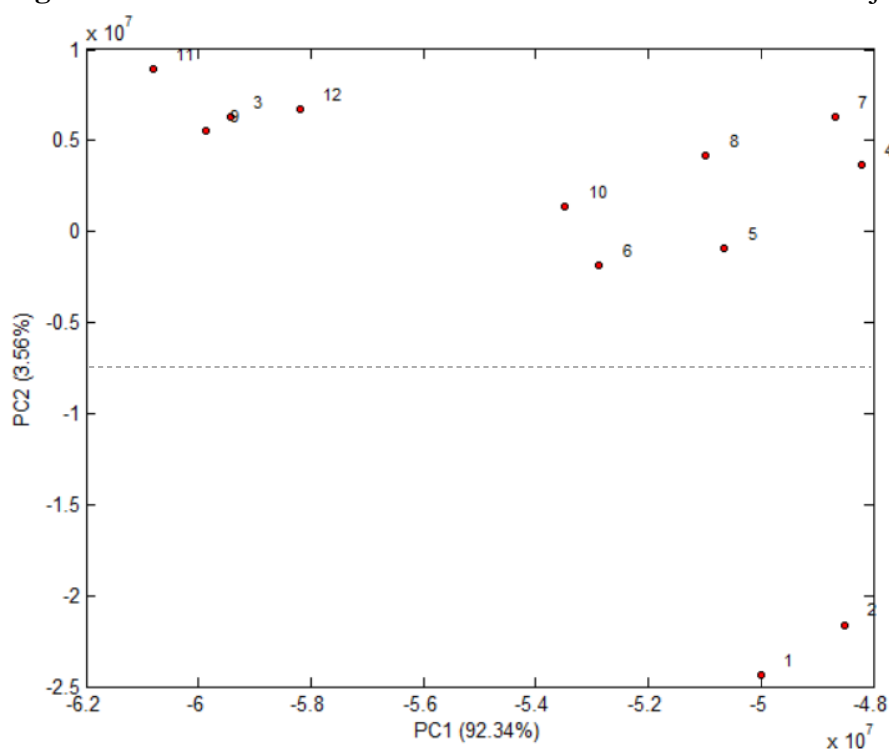


Fonte: Do autor (2021).

### 5.2.1. Análises de Componentes Principais (PCA)

Para a identificação dos compostos voláteis presentes nas amostras de cerveja que apresentaram alterações na intensidade ao longo do processo de DH, aplicou-se a PCA. Dessa maneira, ao expor os dados à tal método, observou-se que houve a separação e/ou agrupamento das amostras no gráfico de *scores* (PC1 x PC2), como exposto na Figura 7, nas quais as amostras 1 e 2 se referem às amostras antes da adição de lúpulo (coleta inicial), enquanto as amostras 3 a 12 se referem às amostras coletadas ao longo do processo de DH.

**Figura 7.** Gráfico de *scores* PC1 x PC2 das doze amostras de cerveja.



Fonte: Do autor (2021).

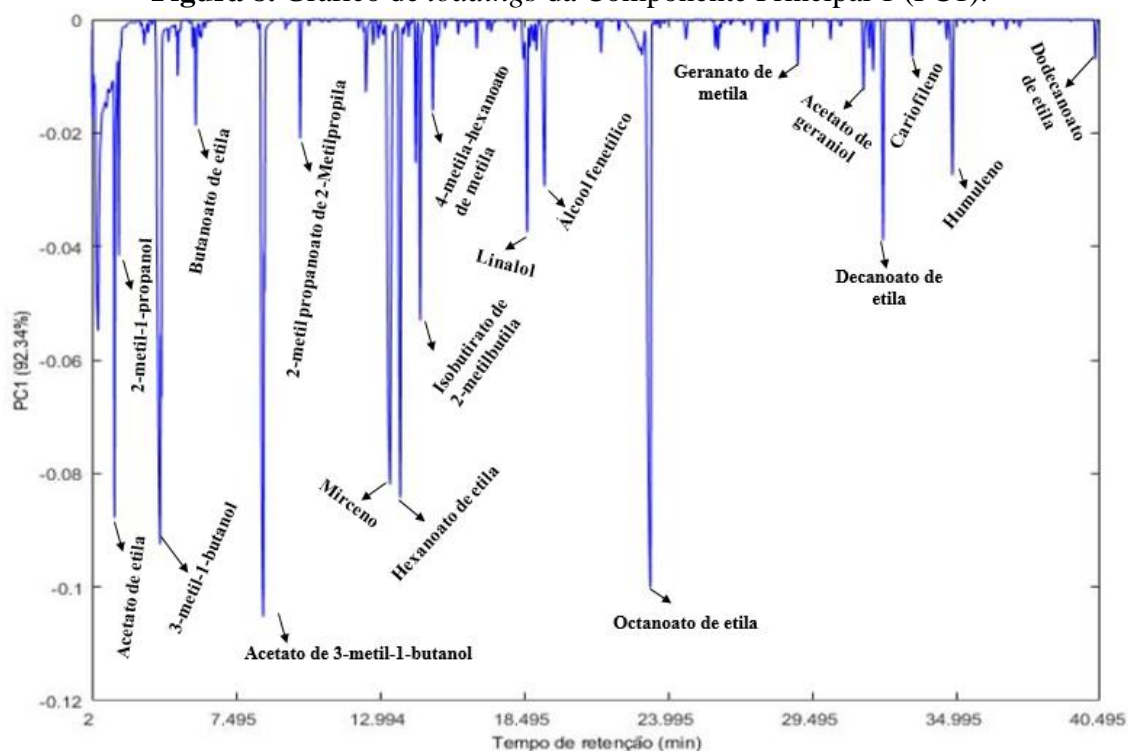
Em relação ao gráfico de *scores* PC1 x PC2 (Figura 7), a PC1 descreve 92,34% da variância experimental e, observando as amostras, é possível verificar que há uma tendência de ordenamento das amostras em função do tempo de DH no qual cada uma foi submetida. Dessa forma, pode-se dizer que quanto mais à esquerda do gráfico a amostra está situada, maior será seu tempo de DH. De maneira oposta, quanto mais à direita a amostra localiza-se no gráfico, o tempo de lupulagem da amostra será menor ou nulo. A PC2 descreve apenas 3,56% da variância experimental, mas apresenta grande importância para esse estudo, pois separa as amostras com DH daquelas que não tiveram contato com o processo de lupulagem. Sendo assim, as amostras na parte inferior do gráfico (abaixo do pontilhado hipotético) não passaram pelo processo de

DH, enquanto as amostras na parte superior do gráfico (acima do pontilhado hipotético) foram submetidas ao DH.

Evidentemente, algumas amostras fogem do padrão estabelecido anteriormente, assim, algumas hipóteses foram desenvolvidas para tais eventualidades. A amostra 3, relativa ao primeiro dia de DH, encontra-se próxima às amostras 11 e 12, com 10 dias de DH. Supostamente, a extração dos compostos por existência de lúpulo em suspensão no frasco de coleta continuou no frasco da amostra 3. Ou seja, o DH conservou-se por um período maior que o desejado. Tal fato também pode ter ocorrido com a amostra 9 ou, então, deve-se supor a probabilidade da volatilização de determinados compostos durante o armazenamento ou no processo de extração da amostra 10, que é referente ao sétimo dia de DH.

Como observado anteriormente por meio do gráfico de *scores*, ressalta-se que há uma tendência de ordenação das amostras em função do tempo de DH na PC1, visto que há uma propensão de que amostras com maior tempo de lupulagem, como as amostras 11 e 12, estejam situadas mais à esquerda. Dessa forma, uma possível interpretação seria considerar que tais amostras são as que apresentam os picos mais intensos para compostos do lúpulo devido ao maior período de DH. Entretanto, esta consideração exhibe algumas divergências, como o fato de outros compostos relacionados à maturação da cerveja também estejam relacionadas a PC1 e não somente os componentes do lúpulo, conforme pode ser observado na Figura 8, que mostra os *loadings* para a PC1.

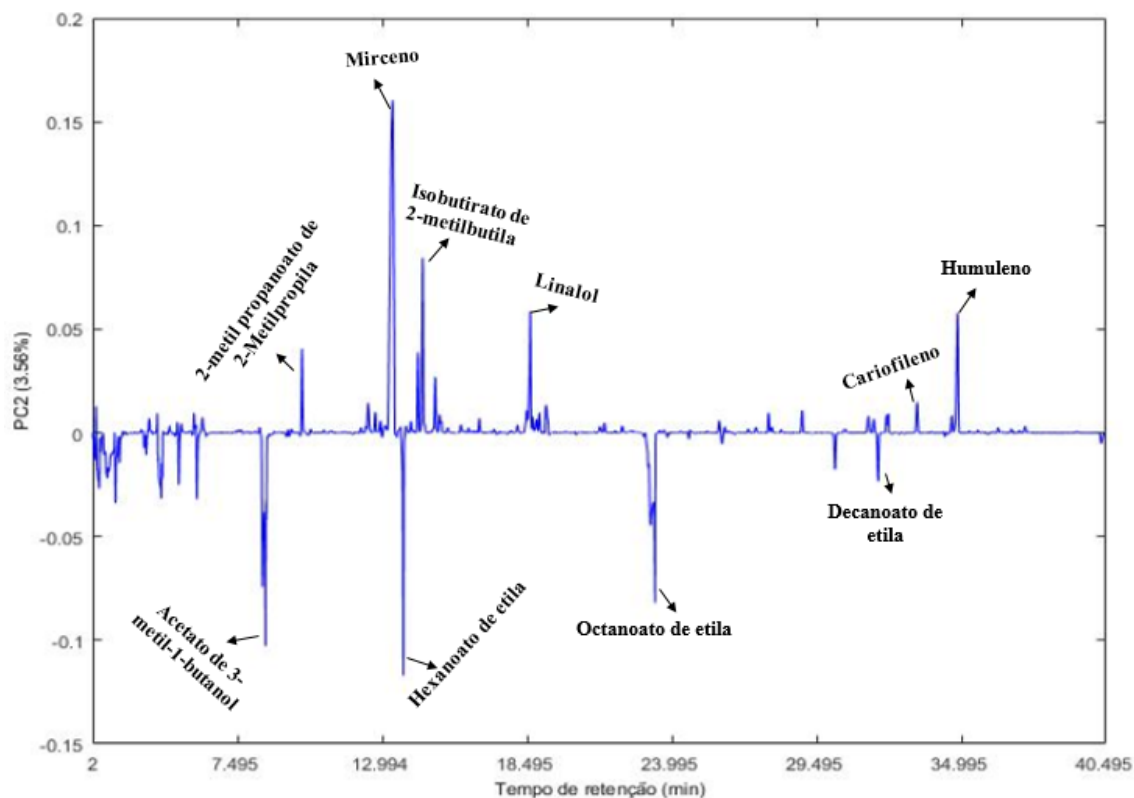
**Figura 8.** Gráfico de *loadings* da Componente Principal 1 (PC1).



Fonte: Do autor (2021).

Vale enfatizar uma possível adversidade neste trabalho, no qual praticamente os mesmos picos estão presentes em todas as amostras. Consequentemente, o que distingue uma amostra das demais é a intensidade de cada pico. Dessa forma, para encontrar quais compostos têm maior peso nos componentes principais 1 (PC1) e componentes principais 2 (PC2), foi preciso verificar os gráficos de *loadings*, apresentados nas Figuras 8 e 9.

**Figura 9.** Gráfico de *loadings* da Componente Principal 2 (PC2).



Fonte: Do autor (2021).

Os gráficos de *loadings* da PC1 e PC2 viabilizam a caracterização de tendências entre as variáveis. Observando a PC1, os picos que tem peso negativo são: acetato de etila (1), 2-metil-1-propanol (2), 3-metil-1-butanol (5), butanoato de etila (8), acetato de 3-metil-1-butanol (9), 2-metil propanoato de 2-metilpropila (10),  $\beta$ -mirceno (12), hexanoato de etila (13), isobutirato de 2-metilbutila (15), 4-metileno-hexanoato de metila (16), linalol (20), álcool fenetílico (22), octanoato de etila (23), geranato de metila (27), acetato de geraniol (29), decanoato de etila (31), cariofileno (32),  $\alpha$ -humuleno (34), dodecanoato de etila (35).

Relativo aos picos que tem peso positivo na PC2 são: 2- metil propanoato de 2-metilpropila (10),  $\beta$ -mirceno (12), isobutirato de 2-metilbutila (15), linalol (20), cariofileno (32),  $\alpha$ -humuleno (34), ao mesmo tempo em que os picos que tem peso negativo na PC2 são: acetato de 3-metil-1-butanol (9), hexanoato de etila (13), octanoato de etila (23), decanoato de etila (31).

Ao observarmos os picos apresentados pela Figura 8, percebe-se que outros compostos, além dos relacionados ao lúpulo, são relevantes para a PC1 e responsáveis também pelas determinações de tendências entre as amostras de cerveja. Sendo assim, as hipóteses abordadas em relação as posições das amostras no gráfico de *scores* não podem ser explicadas somente

pelo tempo de DH em que cada uma foi submetida. Dessa forma, é necessário entender que também está ocorrendo o processo de maturação simultaneamente ao processo de DH.

Ademais, é possível dizer que a maioria dos picos positivos da PC2 possuem uma relação direta com o lúpulo, uma vez que a composição do óleo essencial do lúpulo é formada, principalmente, por hidrocarbonetos ( $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, entre outros) e compostos oxigenados (geraniol, linalol, acetato de geraniol e outros) (ALMAGUER *et al.*, 2014). No entanto, a PC2 apresenta outros picos que não são provenientes do lúpulo, podendo ser relacionados com as etapas de fermentação e maturação da cerveja. Além disso, pode-se dizer que os picos negativos na PC2 devem estar em maior concentração nas amostras sem DH, uma vez que podem diminuir ao longo deste processo em razão de reações secundárias.

Alguns compostos evidenciados pela PC1, decorrentes da etapa de fermentação e maturação, consistem em intermediários metabólicos ou subprodutos produzidos pela levedura, como álcoois superiores e ésteres. Os álcoois superiores e os ésteres são compostos voláteis desejáveis na bebida, contribuindo para aromas e sabores agradáveis e determinando a qualidade da cerveja (PIRES *et al.*, 2014). Entre os compostos identificados, têm-se os álcoois: álcool feniletílico (notas de rosa, floral, mel), 2-metil-1-propanol (solvente), 3-metil-1-butanol (notas de malte, queimado e uísque).

Os ésteres destacados na PC1 são obtidos por reações enzimáticas de ácidos carboxílicos e álcoois, ao mesmo tempo em que etil-ésteres são originados de ácidos graxos de cadeia curta e acetatos derivados de reações com ácido carboxílico (PIRES *et al.*, 2014). Os principais ésteres identificados são: acetato de 3-metil-1-butanol (notas frutadas, doce e banana), butanoato de etila (notas de abacaxi), hexanoato de etila (notas de abacaxi, frutado, doce e verde), octanoato de etila (notas de damasco e banana, frutado). O éster isobutirato de 2-metilbutila (notas frutadas) apresentou picos com intensidades significativas para os dois gráficos de *loadings*, visto que a intensa produção deste éster também ocorre durante a etapa de fermentação, embora um pequeno teor dele possa ser encontrado na composição de alguns tipos de lúpulos (DURELLO, 2019). Já os ésteres terpenos, como geranato de metila e acetato de metila, possuem relação com o lúpulo, assim, durante o DH podem ter suas concentrações elevadas.

No decorrer da etapa de maturação juntamente com a técnica de DH, é possível observar um aumento mínimo na intensidade dos picos de ésteres mencionados acima. Tal fato é consequência da também formação de ésteres responsáveis por aromas e sabores que caracterizam a cerveja no período de maturação. Entre os ésteres produzidos nesta fase, prevalecem o acetato de etila e o acetato de isoamila (CARVALHO *et al.*, 2007). No caso dos



álcoois gerados na fermentação, em específico os álcoois superiores 3-metil-1-butanol e 2-metilpropanol, seus picos podem não sofrer aumentos significativos durante a etapa de maturação. A grande influência (*loadings* elevados) dos picos não diretamente relacionados ao DH pode ser devido à elevada intensidade desses compostos no cromatograma, uma vez que os cromatogramas (picos) não foram autoescalados, uma técnica de pré-processamento de dados.

Quanto aos hidrocarbonetos e compostos oxigenados, obtidos do óleo essencial do lúpulo, presentes na PC1, têm origem também durante a adição de determinados tipos de lúpulos ao final da fervura, os quais permanecem na cerveja, o que justifica a presença desses componentes, ainda que em concentrações baixas nas amostras de “coleta inicial”. Todavia, a concentração desses compostos à bebida pode ser fortemente influenciada pelo DH, conforme observado nos *loadings* para a PC2.

Através da PC2 é possível notar que os picos provenientes do lúpulo que mais se intensificam são o  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno e linalol. Esses compostos são intensificados vigorosamente ao longo de todo o processo de DH durante a maturação, sendo que esta diferença de intensidade já é perceptível nas amostras coletadas no primeiro dia da técnica em questão. Os compostos linalol, geraniol e geranato de metila são produtos da oxidação do monoterpeneo  $\beta$ -mirceno, dessa forma, ao longo do DH, tais compostos tendem a aumentar suas concentrações na cerveja, ao mesmo tempo em que o  $\beta$ -mirceno pode sofrer uma atenuação (HIERONYMUS, 2012). Em relação às amostras da cerveja *American Pale Ale* desse estudo, o pico do  $\beta$ -mirceno não apresentou uma diminuição no decurso do DH, ao invés disso foi possível presenciar um acréscimo mínimo entre cada coleta, isso porque a extração de compostos do lúpulo sucedeu-se até a interrupção da técnica. Já o acetato de geraniol é um éster supostamente obtido pela condensação do geraniol com ácido acético (RETTBERG *et al.*, 2018; HIERONYMUS, 2012). Por fim, era esperado encontrar o pico do farneseno entre os picos evidenciados pela PC2 do gráfico de *loadings*. Em alternativa, pode-se considerar que esse composto não apresenta elevada relevância devido sua baixa concentração no lúpulo *Amarillo* e há a probabilidade desse ter sofrido reações, gerando outros produtos.

Deve-se reforçar a importância de analisar os gráficos de *scores* e *loadings* conjuntamente para a interpretação dos dados submetidos à PCA. Por consequência, identifica-se os compostos que influenciam nas componentes principais ao longo do tempo de DH de cada amostra.

Nesse cenário, o trabalho realizado por Ceola *et al.* (2019), que analisa a influência do tempo de DH (amostras com 4 dias de DH e amostras com 7 dias de DH) e ao tipo de lúpulo (flor ou *pellet*) com os compostos que variam ao longo do tempo, evidenciou que os compostos

relacionados com as amostras com 4 dias de DH são os ésteres propanoato de 1-metilbutil, isobutanoato de 2-metilbutil e humuleno. Quanto às amostras com 7 dias associam-se os aldeídos nonaldeído e decanal (aldeído cáprico), no qual a presença destes compostos em um longo tempo de DH é devido a oxidação dos seus álcoois correspondentes. Compostos importantes para o perfil aromático da cerveja, como  $\alpha$ -humuleno e ésteres, não variaram sua concentração consideravelmente nas análises e os resultados demonstraram apenas a maior formação de compostos oxidados com flores e com DH de 7 dias. Concluindo, o excesso de tempo de DH proporcionou o aumento de ácidos orgânicos e aldeídos, além de uma variação não significativa de compostos aromáticos dos óleos essenciais e de aromas agradáveis.

Contrariamente ao trabalho de Ceola *et al.* (2019), esta pesquisa observou o aumento da intensidade dos picos de compostos voláteis provenientes do lúpulo ao longo do processo de DH, evidenciando a importância da técnica para o perfil aromático da cerveja produzida. Com isso, os diferentes resultados observados entre os trabalhos possivelmente estão relacionados ao processo de produção das cervejas, a quantidade de lúpulo empregada no DH de cada estudo, o uso de tipos e formas de lúpulos diferentes, distinções na realização do DH ou na coleta e preparo de amostras.

Por fim, estudos voltados para a compreensão da ação de compostos voláteis em cervejas submetidas ao DH, até o momento presente, são escassos e limitados. Tudo isso em consonância com a necessidade de também expandir pesquisas sobre as demais linhas diretamente associadas com essa técnica complementar do processo cervejeiro. Além do mais, no decorrer desta pesquisa, foi possível constatar claramente uma modificação no perfil volátil das amostras de cerveja APA, relacionada não só com o processo de DH, mas também à fermentação e maturação da bebida.

## 6. CONCLUSÃO

Neste trabalho, a composição volátil de amostras de cervejas artesanais do estilo APA foi investigada ao longo do processo de DH, buscando a comparação do tempo de lupulagem entre diversas amostras com base no perfil volátil. Com as técnicas de SPME e GC-MS foram realizadas a extração, separação e identificação dos compostos voláteis presentes nas cervejas. A partir disso, com o auxílio de análises quimiométricas, foi possível a identificação de diferenças entre as amostras estudadas, com destaque para os compostos que alteram sua intensidade no decorrer do processo apresentando. Assim, conforme os efeitos da exposição ao DH, buscou-se a classificação das amostras em grupos conforme o tempo de contato da bebida com o lúpulo durante o processo de DH a partir da PCA. Verificou-se uma clara separação das amostras coletadas antes do processo, no dia final e nos dias intermediários, conforme o tempo de DH e das etapas de fermentação e maturação. Também observou-se exceções, que podem ser proporcionados pela presença de extratos de lúpulo em suspensão no frasco de armazenagem e a volatilização de compostos durante a extração e injeções no cromatógrafo.

A partir da análise multivariada dos dados, observou-se também que os compostos identificados apresentavam picos em todas as amostras, incluindo naquelas sem DH. Dessa forma, as discriminações das amostras ocorreram por meio da intensificação da concentração de compostos como ésteres, hidrocarbonetos, compostos oxigenados e álcoois ao longo do DH. No decurso das análises pode-se averiguar a importância das etapas de fermentação e do DH para correlacionar as amostras e caracterizá-las conforme suas similaridades ou diferenças. Também houve certa influência da etapa de maturação da cerveja, esta capaz de intensificar a formação de compostos essenciais para o perfil aromático da bebida. Além disso, compostos presentes em grande quantidade nos óleos essenciais do lúpulo como  $\beta$ -mirceno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno, farneseno e os compostos derivados desses, como linalol, geraniol, geranato de metila, apresentaram as variações mais significativas para essa separação, uma vez que o extenso período de DH acentuou o teor desses na bebida.

Diante desses resultados, considerando a cerveja avaliada, fica evidente a importância do processo de DH para acentuar a presença dos compostos provenientes do lúpulo na cerveja, demonstrando ser um processo de extrema relevância considerando a importância desses compostos para o sabor e aroma dessas bebidas. Além disso, nota-se que a metodologia empregada, utilizando SPME, GC-MS e análises quimiométricas, foi adequada para acompanhar o processo de DH e as alterações do perfil volátil das cervejas ao longo desse período, podendo ser aplicada para outras amostras de cerveja em situações semelhantes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERL, Anita; COELHAN, Mehmet. Determination of Volatile Compounds in Different Hop Varieties by Headspace-Trap GC/MS - In Comparison with Conventional Hop Essential Oil Analysis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 11, p. 2785-2792, 2012.
- ADAMS, Robert P. et al. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation, 2007.
- AKIYAMA, Masayuki et al. Analysis of volatile compounds released during the grinding of roasted coffee beans using solid-phase microextraction. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 7, p. 1961-1969, 2003.
- ALMAGUER, C.; SCHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 2014.
- ALVES, Vera et al. Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. **Food Chemistry**, v. 326, p. 126856, 2020.
- ALVIM, Raquel Patrícia Rungue et al. Identification of volatile organic compounds extracted by headspace solid-phase microextraction in specialty beers produced in Brazil. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 2, p. 219-225, 2017.
- BAMFORTH, C.W. Progress in brewing science and beer production. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2017.
- BARNETT, James A. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850–1880. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 755-771, 2000.
- BARRIONUEVO, Wilma Regina; LANÇAS, Fernando Mauro. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, p. 172-175, 2001.
- BATISTA, Alex Domingues et al. Fibras para SPME (Microextração em fase sólida) recobertas com sílica modificadas por grupos vinila. Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, 2010.
- BECKER, Raquel Wielens. Determinação de anti-inflamatórios em efluente urbano na região de Porto Alegre-RS por SPE, derivatização e GC-MS. 2012.
- BELETI, Marcos Antônio; DUARTE, Felipe; GEORG-KRAEMER, Janaína Endres. A temperatura no desenvolvimento da atividade das enzimas (1-3, 1-4)- $\beta$ -glucanases e degradação de  $\beta$ -glucanos durante a malteação. **Ciência Rural**, v. 42, p. 467-473, 2012.
- BELTRAN, Joaquin; LÓPEZ, Francisco J.; HERNÁNDEZ, Félix. Solid-phase microextraction in pesticide residue analysis. **Journal of chromatography A**, v. 885, n. 1-2, p. 389-404, 2000.

BERNARDES, Cristina Donizeti. Métodos analíticos para cachaças utilizando técnicas espectrométricas, cromatográficas e quimiométricas. 2015.

BLEIER, B. et al. **Craft Beer Production**. University of Pennsylvania. Philadelphia – Pennsylvania, 2013.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, EC de; QUEIROZ, M. E. C. Preparo de amostras para análise de compostos orgânicos. **GEN, editor. Rio de Janeiro: Editora LTC**, 2015.

BRASIL (a). Decreto nº 65, de 11 de novembro de 2019. Dispõe sobre a padronização, classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 11 de dezembro de 2020, 2019.

\_\_\_\_\_ (b). Decreto nº 6871, de 4 de Junho de 2009. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 2009.

CARASEK, Eduardo; TONJES, Jussara Wick; SCHARF, Mauro. Pré-concentração de chumbo e cádmio em um sistema de micro extração líquido-líquido e determinação por espectrometria de absorção atômica com chama. **Química Nova**, v. 25, p. 748-752, 2002.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 3ª parte—A Maturação. **Revista Analytica**, v. 27, p. 69-74, 2007.

CEOLA, D.; HUELSMANN, R. D.; DA-COL, J. A.; MARTENDAL, E. Headspace-solid phase microextraction and GC-MS followed by multivariate data analysis to study the effect of hop processing type and dry hopping time on the aromatic profile of top-fermented beers. **Separation Science Plus**, 2019.

COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto Leite; BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas – SP: Editora da UNICAMP, 7ª ed., 1997.

CORREIA, Paulo R. M.; FERREIRA, Márcia. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, p. 481-487, 2007.

DENNENLÖHR, Johanna et al. Analysis of selected staling aldehydes in wort and beer by GC-EI-MS/MS using HS-SPME with on-fiber derivatization. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 78, n. 4, p. 284-298, 2020a.

DENNENLÖHR, Johanna; THÖRNER, Sarah; RETTBERG, Nils. Analysis of hop-derived thiols in beer using on-fiber derivatization in combination with hs-spme and gc-ms/ms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 50, p. 15036-15047, 2020b.

DENNENLÖHR, Johanna et al. Analysis of Selected Hop Aroma Compounds in Commercial Lager and Craft Beers Using HS-SPME-GC-MS/MS. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 78, n. 1, p. 16-31, 2020c.

DRAGONE, G.; SILVA, T. A. O.; SILVA, J.B.A. Cerveja. In: VENTURINI FILHO, W.G. *Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia*. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2016. cap. 3. p. 51-84.

DOS SANTOS, R. R.; ORLANDO, R. M.; CARDEAL, Z. de L.; MENEZES, H. C. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons and derivatives in beer using a new cold fiber-solid phase microextraction system. **Food Control**, v. 126, p. 108104, 2021.

DURELLO, Renato S.; SILVA, Lucas M. ; BOGUSZ, Stanislaw. Química do Lúpulo. **Química Nova** , v. 42, p. 900-919, 2019.

DURELLO, Renato da Silva. **Química do sabor de cervejas: detalhes moleculares de lúpulos (*Humulus lupulus*) cultivados no Brasil no processo cervejeiro**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

EYRES, Graham T.; MARRIOTT, Philip J.; DUFOUR, Jean-Pierre. Comparison of odor-active compounds in the spicy fraction of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oil from four different varieties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6252-6261, 2007.

FERREIRA, Márcia et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Quim. Nova**, 22, 724-731, 1999.

FILHO, Waldemar Gastoni Venturini; CEREDA, Marney Pascoli. Cerveja. In: AQUARONE, Eugênio et al. (Coord.). *Biotechnology Industrial: Biotechnology na produção de alimentos*. v. 4, São Paulo, SP: Edgard Blücher Ltda., 2001.

GEMPERLINE, Paul. **Practical guide to chemometrics**. CRC press, 2006.

GHESTI, G.; BARROS, C.R.; PARACHIN, N.; MÜLLER, C.; PINHEIRO, L. **Análise Sensorial para Cervejas**. [s.l.] LaBCCERva - Laboratório de Bioprocessos Cervejeiros e 60 Catálise em Energias Renováveis - Instituto de Química - Universidade de Brasília, 2018.

GOMES, Fábio de Oliveira; GUIMARÃES, B. P.; CEOLA, D.; GUESTI, G. F. Advances in dry hopping for industrial brewing: a review. **Food Science and Technology**, 2021.

GRAHAM, G. S.; FERGUS G. P. *Handbook of Brewing*. Second Edi., Boca Raton: [s.n.], 2006.

GUIMARÃES, Bernardo Pontes. Avaliação do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) cultivado no Distrito Federal para uso cervejeiro. 2021.

HALEY, J.; PEPPARD, T. L. Differences in utilization of the essential oil of hops during the production of dry-hopped and late-hopped beers. *J. Inst. Brew.* 89:87-91, 1983.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*, Editora LTC, 8ª edição, 2012.

HIERONYMUS, Stan. *For the love of hops; The practical guide to aroma, bitterness and the culture of hops*. Brewers Association, Boulder, Colorado. Primeira edição, 2012.

HORNINK, G. G., GALEMBECK, G. Glossário cervejeiro: da cultura à ciência. Alfenas: UNIFAL, 2019.

IRVING, Harry MNH; FREISER, Henry; WEST, Thomas Summers. **Compendium of analytical nomenclature: definitive rules 1977**. Pergamon Press, 1ª ed., 1978.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em fase sólida: fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

JUNIOR, Amaro A. D.; VIEIRA, Antonia G.; FERREIRA, Taciano P. Processo de produção de cerveja. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 6, p. 61-71, 2009.

KOMATSU, Emy; VAZ, Jorge Moreira. Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de pesticidas em amostras de água empregando microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 27, p. 720-724, 2004.

KUCHARCZYK, Krzysztof; TUSZYŃSKI, Tadeusz. The effect of pitching rate on fermentation, maturation and flavour compounds of beer produced on an industrial scale. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 3, p. 349-355, 2015.

KUNZ, T. et al. Possibilities to improve the antioxidative capacity of beer by optimized hopping regimes. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 415-425, 2014.

KUNZE, Wolfgang. Technology brewing and malting. Berlin: VLB, 1997.

LANÇAS, Fernando Mauro; MCNAIR, Harold M. Cromatografia em fase gasosa: 1. Teoria elementar. **Química Nova**, São Paulo, v. 6, p. 6-13, 1983.

LIGOR, Magdalena et al. Comparative gas chromatographic–mass spectrometric evaluation of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oils and extracts obtained using different sample preparation methods. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 7, p. 1433-1442, 2014.

MARTINS, Manoel Leonardo et al. Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) fundamentos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 35-51, 2012.

MATA, Adriana R.; NELSON, D. L.; AFONSO, R. J. C. F.; GLÓRIA, M. B. A.; JUNQUEIRA, R. G. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. **Food Science and Technology**, v. 24, p. 151-157, 2004.

MATOS, Ricardo Augusto Grasel et al. Cerveja: panorama do mercado, produção artesanal, e avaliação de aceitação e preferência. 2011.

MENEZES, Helvecio Costa. **Análise ambiental de benzeno e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos por microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas**. Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, 2011.

MEUSSDOERFFER, F.G. A comprehensive history of beer brewing. Handbook of brewing: Processes, technology, markets, 2009.

MOIR, Michael. Hops—a millennium review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 58, n. 4, p. 131-146, 2000.

MOITA NETO, José Machado; MOITA, Graziella Ciaramella. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química nova**, v. 21, p. 467-469, 1998.

MORADO, R. Larousse da cerveja. São Paulo: Alaúde, 2017.

NIELSEN, Niels-Peter Vest; CARSTENSEN, Jens Michael; SMEDSGAARD, Jørn. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. **Journal of chromatography A**, v. 805, n. 1-2, p. 17-35, 1998.

NORDSTROM, K. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast III. Participation of coenzyme A. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 68, p. 398-407, 1962.  
OLIVER, M. **The Oxford Companion to Beer**. MENDES, I. (ed.); FILHO, W.G.V. (org.). São Paulo: Editora Blucher, 2020.

PALMER, J. How to brew: Everything you need to know to brew great beer every time. **Brewers Publications**, 2017.

PARREIRA, Fabrício Vilela; CARDEAL, Zenilda de Lourdes. Amostragem de compostos orgânicos voláteis no ar utilizando a técnica de microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 646-654, 2005.

PEREIRA, Paulo Cesar de Souza et al. A quimiometria nos cursos de graduação em química: proposta do uso da análise multivariada na determinação de  $pK^a$ . **Química Nova**, v. 37, p. 1417-1425, 2014.

PIRES, Eduardo J. et al. Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1937-1949, 2014.

POLO, Maria et al. Multivariate optimization of a solid-phase microextraction method for the analysis of phthalate esters in environmental waters. **Journal of Chromatography A**, v. 1072, n. 1, p. 63-72, 2005.

QUEIROZ, Maria Eugênia C. Microextração em fase sólida no capilar (in-tube SPME) para automação das análises de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, 2009.

QUEIROZ, Sonia CN; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel CSF. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.

RETTBERG, Nils; BIENDL, Martin; GARBE, Leif-Alexander. Hop aroma and hoppy beer flavor: chemical backgrounds and analytical tools—a review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 76, n. 1, p. 1-20, 2018.



ROBERTS, Trevor R.; FALCONER, Russell. Hops. In: STEWART, Graham. G. et al. Handbook of brewing. Boca Raton - Florida: Taylor & Francis Group, 2018, p. 148-223.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A química da cerveja. **Química nova escola**. vol. 37, n°2, p. 98-105, 2015.

RUVALCABA, José E. et al. Desenvolvimento de um método de extração sorptiva com barra de agitação para estudar perfis de voláteis de diferentes estilos de cerveja. **Food Research International**, v. 126, p. 108680, 2019.

SANTOS, S. P. **Os Primórdios da Cerveja no Brasil**. Ateliê Editorial. 1 ed., Cotia, 2003.

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

SKOOG et al. **FUNDAMENTOS DE QUÍMICA ANALÍTICA**. Tradução da 8ª Edição norte-americana. Editora Thomson, 2006.

STEWART, Graham G.; RUSSELL, Inge; ANSTRUTHER, Anne (Ed.). **Handbook of brewing**. CRC Press, 2018.

SOUZA-SILVA, Erica A.; LOPEZ-AVILA, Viorica; PAWLISZYN, Janusz. Fast and robust direct immersion solid phase microextraction coupled with gas chromatography—time-of-flight mass spectrometry method employing a matrix compatible fiber for determination of triazole fungicides in fruits. **Journal of chromatography**, v. 1313, p. 139-146, 2013.

SOUZA, André Marcelo de. **Análise exploratória multivariada empregando o perfil cromatográfico de compostos carbonílicos na atmosfera da cidade de São Paulo**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – USP, 2010.

TAYLOR, D. G. Aging, dilution and filtration. In: STEWART, Graham. G. et al. Handbook of brewing. Boca Raton - Florida: Taylor & Francis Group, 2018, p. 454-483.

VALENTE, Antonio Luiz Pires; AUGUSTO, Fabio. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, p. 523-530, 2000.

VIEIRA, Ana C. et al. Multi-target optimization of solid phase microextraction to analyse key flavour compounds in wort and beer. **Food chemistry**, v. 317, p. 126466, 2020.

VIEIRA, Fernanda SV; REBOUÇAS, Márcio V.; ANDRADE, Jailson B. de. Determinação de compostos carbonilados e carboxilados em derivados de petróleo. **Química Nova**, v. 35, p. 1644-1656, 2012.

VIEGAS, Marcelo Caldeira; BASSOLI, Denisley Gentil. Utilização do índice de retenção linear para caracterização de compostos voláteis em café solúvel utilizando GC-MS e coluna HP-Innowax. **Química nova**, v. 30, n. 8, p. 2031-2034, 2007.

VON MÜHLEN, Carin. Índices de retenção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente. **Sci Chromatogr**, v. 1, n. 3, p. 21-8, 2009.

WYLER, Patricia. **Influência da madeira de carvalho na qualidade da cerveja**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo – USP, 2013.

ZHANG, Jingxin; CHEN, Maoyin; HONG, Xia. Nonlinear process monitoring using a mixture of probabilistic PCA with clusterings. **Neurocomputing**, v. 458, p. 319-326, 2021.