



THAMYRES VICTÓRIA QUARESMA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA POR *HEADSPACE*
SPME-GC-MS DE CERVEJAS PRODUZIDAS VIA *DRY*
HOPPING E VIA ADIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
LÚPULO.**

**LAVRAS-MG
2022**

THAMYRES VICTÓRIA QUARESMA GONÇALVES

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA POR *HEADSPACE*
SPME-GC-MS DE CERVEJAS PRODUZIDAS VIA *DRY*
HOPPING E VIA ADIÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
LÚPULO.**

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

Prof. Dr. Márcio Pozzobon Pedroso
Orientador

Msc. Letícia Fagundes Pereira
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2022**

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Patrícia, e ao meu padrasto, Leandro, por todo o suporte, incentivo, diálogo, amor acolhedor e confiança. Obrigada por não medirem esforços pela minha vida acadêmica e tornar este sonho realidade.

Ao meu pai, Luiz, e minha avó Augusta pelo amor e apoio.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Química, pela oportunidade de formação acadêmica.

Ao Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso pelos ensinamentos, disponibilidade e paciência, e por me inspirar enquanto futura profissional educadora.

À minha coorientadora Ma. Leticia Fagundes Pereira, por sempre que possível incentivar meu crescimento acadêmico, auxiliar em questões psicológicas e científicas, e acreditar na minha capacidade de forma integral.

Ao Prof. Dr Mário César Guerreiro, por aceitar fazer parte da banca e por contribuir para a finalização deste 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) e a Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ), por todo apoio e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Profª Drª. Maria das Graças Cardoso, por ceder espaço no Laboratório de Óleos Essenciais para a extração do material e contribuindo com este trabalho.

À todos que fizeram parte da diretoria executiva da Associação Atlética Acadêmica das Ciências Odisseia da UFLA (A.A.A.C.O.U.) que viabilizaram através de seu trabalho um projeto para a comunidade acadêmica ao qual tenho orgulho em fazer parte da fundação, pela amizade, ensinamentos e vivências.

Aos meus amigos pelo companheirismo, suporte, palavras de conforto e estímulo. Obrigada pelas descontrações e por nunca me deixarem desistir em meio a tantas dificuldades e cobranças. Em especial aos meus amigos Kathiquely, Pedro e Luiz.

Aos meus gatos Tesla e Faraday pela cumplicidade e suporte emocional.

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

RESUMO

A cerveja é uma bebida com abundante importância histórica dentro da nossa sociedade como um todo, junto a isto, também é a bebida alcoólica mais consumida no mundo. Dentre os componentes da cerveja, destaca-se o lúpulo, responsável pelas características de sabor e aroma na bebida. Tendo em vista a constante expansão do mercado cervejeiro e produtores que cada vez mais visam aumentar o aroma da bebida, a atenção à presença de terpenos aromáticos em solução se mostra crescente. Em virtude disso, lupulagens adicionais são feitas para melhorar propriedades organolépticas da cerveja, como é o caso do *dry hopping*, realizando-se uma lupulagem em temperaturas mais baixas. Desta forma, pensou-se em adicionar óleo essencial de lúpulo diretamente à bebida, considerando que o mesmo é fonte rica em terpenos, e comparar os resultados obtidos para as frações voláteis das duas técnicas. Assim, o objetivo dessa pesquisa é comparar o perfil volátil de cervejas produzidas com lúpulo adicionado na etapa de *dry hopping* (DH) com cervejas produzidas empregando a adição de óleo essencial (OE) de lúpulo, buscando verificar se a adição de OE de lúpulo aumenta a concentração de terpenos e terpenóides na cerveja. Para a análise das cervejas, empregou-se a microextração em fase sólida (SPME) com posterior análise por cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas (GC-MS), viabilizando a extração, separação e identificação destes compostos. Por fim, foi feita a análise de componentes principais (PCA) possibilitando a comparação quimiométrica da fração volátil de ambas as adições. Assim, com as análises observou-se a separação entre as amostras com DH e com adição de OE, bem como da indicação da intensidade desses compostos presentes no lúpulo nas diferentes categorias de amostras. Os compostos acetato de etila, álcool isoamílico, mirceno, dodecanoato de etila, cariofileno e α -humuleno foram mais intensos nas amostras de DH, enquanto que os compostos acetato de isoamila, propanoato de 2-metil-1-butanol, isobutirato de 2-metilbutila, linalol, isovalerato de 2-metilbutil, octanoato de etila, 2-undecanona, geranato de metila, acetato de geraniol e propionato de geranila foram mais intensos nas amostras de OE. Entretanto, apenas alguns desses compostos são originários do lúpulo, como é o caso do mirceno, cariofileno e α -humuleno para as amostras de DH, e do linalol, geranato de metila, acetato de geraniol e propionato de geranila para as amostras de OE, havendo contribuições de compostos originados na fermentação. A diferença entre as duas amostras pode ser explicada por meio

do equilíbrio entre ésteres, reações de oxidação de terpenos e terpenóides e condições advindas da maturação.

Palavras-chave: Cerveja Artesanal. *Dry hopping*. Compostos voláteis. GC-MS. SPME.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Figura 1: Estruturas químicas dos principais α -ácidos (humulonas) do lúpulo.....	16
Figura 2 – Estrutura química de terpenos e terpenóides.	19
Figura 3 – Cromatograma da amostra de OE do lúpulo <i>Columbus</i>	26
Figura 4 – Cromatograma das amostras de cerveja submetida a adição de OE (Fig. 4A) e submetidas ao DH (Fig. 4B).	29
Figura 5 – Fragmentos de cromatograma desalinhado (Fig.5A) e alinhado (Fig. 5B).	35
Figura 6 – Gráfico de <i>scores</i> (PC1 X PC2).	36
Figura 7 – Gráfico de <i>loadings</i> da PC1.....	37
Figura 8 – Gráfico de <i>loadings</i> da PC2.
.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Componentes encontrados no lúpulo.	27
Tabela 2 - Compostos identificados nas amostras de cervejas empregadas no estudo.	30

LISTA DE SIGLAS

AMDIS	<i>Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System</i>
COW	Correlação otimizada de deformação (do inglês <i>Correlation Optimized Warping</i>)
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>)
HS-SPME	Microextração em fase sólida por <i>headspace</i> (do inglês <i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i>)
IBU	Unidades Internacionais de Amargor (do inglês <i>International Bitterness Units</i>)
IR	Índice de Retenção
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês <i>National Institute of Standards and Technology</i>)
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
SPME	Microextração em Fase Sólida (do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Uma breve história da cerveja.....	13
2.2 Processo de produção de cervejas.....	13
2.3 O Lúpulo.....	15
2.4 Óleo Essencial de Lúpulo.....	17
2.5 Microextração em fase sólida (SPME) e Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).....	19
2.6 Quimiometria.....	21
3. METODOLOGIA	23
3.1 Materiais.....	23
3.2 Amostras.....	23
3.3 Análise por SPME-GM-MS.....	23
3.4 Identificação dos compostos/Processamento de dados.....	24
3.5 Análise quimiométrica.....	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	26
4.1 Identificação da fração volátil.....	25
4.2 Análises Quimiométricas	34
5. CONCLUSÃO	42
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1. INTRODUÇÃO

A cerveja, bebida alcoólica mais consumida no mundo, é basicamente uma bebida aquosa fermentada a base de amido e aromatizada com lúpulo, abrangendo assim os quatro componentes principais no seu processo de fabricação: água, fermento, malte e lúpulo (DE KEUKELEIRE, 1999). Sua primeira aparição é atribuída a região da Mesopotâmia, berço de muitas civilizações, onde a bebida foi comum por milênios. O conhecimento acerca da bebida foi passado aos gregos e romanos que, conhecidos por serem bebedores inatos de vinho, geraram um estigma social pautado em preconceitos relacionados à bebida. Assim, embora saiba-se que os antigos celtas e os alemães fossem bebedores de cerveja, os relatos da mesma aparecem novamente na Idade Média, através (dentre outros) dos monges, conhecidos por suas importantes contribuições (NELSON, 2005).

O processo de fabricação de cerveja é basicamente composto por sete etapas indispensáveis: moagem do malte; mosturação ou brassagem; filtração do mosto; fervura do mosto; fermentação, maturação e o envase. Iniciando-se pela moagem, onde os grãos de cereais maltados são moídos em pequenos fragmentos. Seguindo-se pela mosturação, onde é feita a mistura do malte moído com água em temperatura controlada (mosto), com o intuito de facilitar a hidrólise do amido em açúcares fermentáveis. No momento de filtração e fervura do mosto é onde o lúpulo é adicionado, com o intuito de estabilizar o mosto e conferir sabor e amargor à bebida. Terminada a fervura, que visa a esterilização e concentração do mosto, elimina-se o *trub*, por filtração ou decantação, e resfria-se o mosto. A fermentação é a etapa na qual o amido hidrolisado em açúcares fermentáveis é transformado em álcool e gás carbônico, por meio de atividades do fermento. Na maturação a cerveja descansa em baixas temperaturas, entre 0 e 3°C. Por fim, ocorre o envase (e rotulagem) da bebida em garrafas, barris ou latas (AMBEV, 2022; BORTOLI *et al.*, 2013).

O lúpulo é o insumo mais importante para conferir características aromáticas e de amargor à bebida, por apresentar glândulas de lupulina que produzem e armazenam compostos relacionados a estas características. Dentre os compostos do lúpulo relacionados a estas funções, destacam-se as resinas totais (15 - 30% da composição dos cones de lúpulo secos) e os óleos essenciais (OE) como principais constituintes. As resinas apresentam α -ácidos (humulonas) que tornam-se solúveis após isomerização, sendo responsáveis pelo

amargor característico. Já os óleos essenciais, mesmo altamente voláteis, conferem ao mosto e à cerveja o caráter aromático do lúpulo (DRAGONE *et al.*, 2016).

Os óleos essenciais representam de 0,5 - 3,0% do lúpulo seco, sendo compostos por terpenos, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas. Por meio de técnicas cromatográficas avançadas foi possível identificar centenas de compostos voláteis no OE de lúpulo, muitos deles com grande impacto aromático. Entretanto, pode-se ocorrer a perda de até 98% desses compostos no processo de fervura do mosto em decorrência da volatilidade dos mesmos. Por isso, uma alternativa para intensificar o aroma de lúpulo na cerveja é realizar a lupulagem de forma tardia. A técnica de *dry hopping* (DH) é um exemplo de uma lupulagem tardia, conhecida por ser uma técnica empregada na temperatura de fermentação, pode ser empregada durante a fermentação, ao longo da fase de maturação, ou quando a cerveja já está armazenada em barril (DIETZ *et al.*, 2020; DRAGONE *et al.*, 2016). Essa etapa tem por finalidade aumentar o aroma de lúpulo na cerveja, e por ser realizada em temperatura mais baixa que a fervura, os terpenos voláteis de aroma presentes são mais retidos (ocorre menos perda por volatilização). Por outro lado, como a temperatura é mais baixa que na fervura, a extração desses terpenos é desfavorecida.

Frente às adversidades envolvendo a volatilidade do OE de lúpulo e a baixa extração de terpenos em temperaturas mais brandas, tem-se como alternativa a adição de OE diretamente na bebida depois da fermentação, almejando-se reter mais esses compostos na bebida devido à maior disponibilidade de terpenos em solução quando comparada a lupulagem tardia..

A análise da composição da fração volátil das cervejas submetidas ao processo de DH, quanto das cervejas com adição de OE, podem ser efetuadas por meio da microextração em fase sólida (SPME) no modo *headspace* (HS) e da cromatografia gasosa associada a espectrometria de massas (GC-MS). A SPME é uma técnica de extração que envolve uma fibra de sílica fundida com um filme polimérico imersa na amostra ou, então, colocada no *headspace*, onde não ocorre contato da fibra com a solução, extraindo apenas os voláteis. Após a extração, os analitos são dessorvidos no injetor do cromatógrafo a gás ou na fase móvel do cromatógrafo a líquido (CALDAS *et al.*, 2011).

Na GC, os componentes de uma amostra são separados em função da distribuição deles entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida mantida em uma coluna. Após a separação dos compostos ao longo da coluna cromatográfica, no caso da

GC-MS, as moléculas dos analitos são introduzidas num espectrômetro de massas (MS) e convertidas em íons, aplicando-se energia a eles, separando-os com base na razão massa-carga (m/z) (SKOOG *et al.*, 2006).

Os cromatogramas das amostras com DH e com OE devem ser semelhantes, considerando a mesma natureza das amostras (estilo de cerveja, leveduras e variedade de lúpulo), desta forma, não espera-se encontrar compostos distintos entre amostras e sim diferença de intensidade entre picos. Posto isto, almejando-se identificar padrões para melhor visualização e interpretação dos resultados obtidos mediante as análises de SPME e GC-MS, faz-se necessário a utilização de métodos quimiométricos, uma vez que a avaliação visual pode não ser adequada e gerando interpretação errônea dos dados. A quimiometria engloba técnicas e operações associadas ao tratamento matemático-estatístico juntamente à interpretação de dados químicos. Dentre os métodos quimiométricos, pode-se mencionar a Análise de Componentes Principais (PCA).

Desse modo, o presente trabalho buscou empregar técnicas de SPME-HS e GC-MS para a investigação de compostos voláteis de cervejas artesanais obtidas com adição direta de OE de lúpulo e cervejas produzidas com a etapa de DH com a adição de lúpulo em *pellet*, em quantidades correspondentes, responsáveis ativamente por propriedades organolépticas importantes das cervejas.

As análises foram viabilizadas utilizando-se de métodos quimiométricos, verificando se a adição direta do óleo essencial do lúpulo em substituição ao DH causa alterações no perfil volátil, por meio da PCA, para investigar uma possível discriminação entre as amostras com DH e com OE e identificar os compostos voláteis responsáveis pela diferenciação entre as amostras.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Uma breve história da cerveja

A história da cerveja tem seu início incerto, visto que os materiais necessários para a fabricação da bebida estão disponíveis na natureza em quantidades suficientes desde antes da Revolução Neolítica. Algumas evidências mais antigas apontam algo similar a cerveja consumida e produzida na China a mais de 7000 anos, mas foi na região fértil entre os rios Tigres e Eufrates, na região da Mesopotâmia, que se encontrou comprovação arqueológica para a produção da bebida (NELSON, 2005).

Em seus primórdios, a fabricação de cerveja era vista como uma tarefa feminina. Isso porque os egípcios viam a tarefa como doméstica, bem como cozinhar, e acreditavam que a deusa Hathor era a “inventora da fabricação de cerveja”. Porém, na Idade Média com a expansão e popularização do Cristianismo e dos grandes mosteiros, os homens assumiram essa tarefa das mulheres, que continuam fabricando cerveja apenas em pequenas cervejarias caseiras. A grande inovação foi a contribuição de monges alemães que começaram a adicionar lúpulo em suas cervejas para contribuir com a preservação da bebida, para além de conferir amargor (POELMANS, 2012).

Na idade média, o lúpulo foi introduzido como matéria prima, gerando avanços na arte cervejeira, em decorrência da crescente demanda por produção. Em 1516, o Duque Guilherme IV da Bavária da Alemanha, aprovou a lei alemã Reinheitsgebot, que contemplava como matéria prima da cerveja somente cevada, lúpulo e água (DRAGONE *et al.*, 2016).

No Brasil a bebida ficou conhecida com a chegada da família real portuguesa, em 1808, que veio ao então Brasil colônia em decorrência da invasão de Napoleão Bonaparte. Assim, com a abertura dos portos às nações amigas, os ingleses foram os primeiros a introduzir a cerveja em solo nacional (MEGA *et al.*, 2011).

2.2 Processo de produção de cervejas

De acordo com a Instrução Normativa nº 65 do Ministro da Agricultura, Pecuária e Abastecimento publicado em 10 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).

O processo de produção de cerveja compreende 7 etapas: moagem do malte; mosturação ou brassagem; filtração do mosto; fervura do mosto; fermentação, maturação e o envase, e é pautada em 4 matérias primas principais, sendo elas, a água, o fermento, o malte e o lúpulo.

A moagem do malte contempla as funções de influenciar a velocidade das transformações físico-químicas, tempo de filtração do mosto, ação das enzimas no amido e, conseqüentemente, qualidade do produto final. Isso porque se moído muito fino pode entupir na filtração, e muito grosso pode dificultar a hidrólise do amido (BORTOLI *et al.*, 2013).

Na mosturação ocorre a junção do malte corretamente moído à água em temperatura controlada, assim almejando tanto solubilizar as substâncias do malte diretamente solúveis em água, quanto solubilizar as substâncias insolúveis, com o auxílio das enzimas, promovendo a gomificação e posterior hidrólise do amido em açúcares (DRAGONE *et al.*, 2016).

Após a filtração, a mistura açucarada conhecida como mosto é transferida para um caldeirão, onde passa pelo processo de fervura por pelo menos uma hora na presença de lúpulo. O lúpulo é adicionado para garantir perfis sensoriais característicos, adicionalmente a isto, ele promove a formação de complexos insolúveis com proteínas e polipeptídeos, contribuindo para a estabilidade coloidal da bebida (KEUKELEIRE, 2000).

Durante a fermentação ocorre a conversão de açúcares fermentáveis em etanol e dióxido de carbono. Esses açúcares são provenientes da quebra do amido feita pela amilase na mosturação, e o mais abundante desses açúcares é a maltose, representando cerca de 50–70% de todos os açúcares fermentáveis no mosto. O consumo desses açúcares ocorre em uma sequência específica: primeiramente é consumida a glicose, seguida pela frutose, maltose e maltotriose, isso em decorrência do tamanho das moléculas (HUI, *et al.*, 2007).

Ao final da fermentação primária a cerveja é chamada de “cerveja verde”, em decorrência da baixa concentração de dióxido de carbono, o que implica em sabores e aromas qualitativamente inferiores ao do produto comercializado. A fim de confirmar estas características, deve-se passar a bebida pelo processo de maturação, também conhecido como *lagering*. Durante o processo, em temperaturas mais brandas, acontece uma fermentação secundária, em decorrência da pequena quantidade de leveduras restante na cerveja. A maturação viabiliza a clarificação pela precipitação de leveduras e proteínas, bem como de sólidos insolúveis, assim, o processo de maturação proporciona as características

organolépticas finais do produto e a carbonatação natural da cerveja (DRAGONE *et al.*, 2016). Por fim, o processo de rotulagem e envase em garrafas, barris ou latas é precedido pela estocagem em tanques do produto final.

2.3 O Lúpulo

Adicionado ao processo cervejeiro na Idade Média, e responsável por características de aroma e sabor, o lúpulo é uma planta angiosperma dióica, perene e trepadeira. A planta pertence à ordem das Rosales, dividindo família (*Cannabaceae*) com a *C. Sativa*, único outro gênero da família além do *Humulus*. Este gênero, por sua vez, é representado por 3 espécies: *H. Japonicus*, *H. Lupulus* e *H. Yunnanesis*.

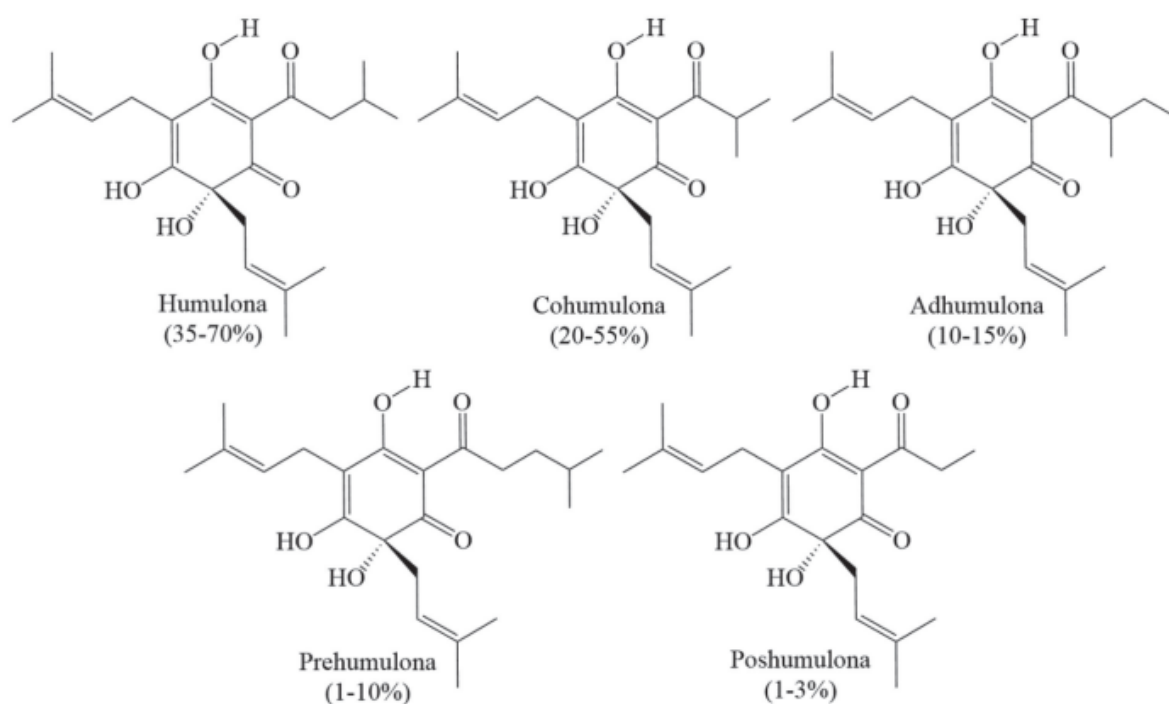
Somente a espécie *Humulus lupulus* é utilizada pela indústria cervejeira, sendo 97% da produção mundial desta destinada para a produção da bebida. Isso acontece, pois, a espécie é a única que apresenta glândulas de lupulina, responsáveis pela sintetização de componentes químicos do lúpulo, destacando-se as resinas e os óleos essenciais como relevantes para princípios cervejeiros. Para além das características sensoriais já pontuadas previamente, as resinas presentes também ajudam a promover a formação de espuma, ao mesmo tempo que estabilizam e melhoram a espuma da cerveja (ALMAGUER *et al.*, 2014).

Como dito anteriormente, de acordo com Keukeleire, o lúpulo é adicionado para garantir perfis sensoriais característicos durante a etapa de fervura do mosto, antecedida pela etapa de filtração. Esses perfis sensoriais estão relacionados aos componentes químicos da planta, sintetizados e armazenados nas glândulas de lupulina, as resinas e os óleos essenciais.

As resinas totais presentes representam cerca de 15 - 30% do peso dos cones de lúpulos secos, sendo separadas em resinas macias (10 - 25%) e resinas duras (3 - 5%). As resinas macias contemplam dois subgrupos, os α -ácidos e a fração- β (β -ácidos e resinas moles não caracterizadas). Os α -ácidos são notoriamente os compostos de mais influência nas características das resinas, isso porque ao adicionar-se o lúpulo ao mosto as resinas são extraídas e termicamente isomerizadas, conferindo o amargor característico da bebida/estilo. Por exemplo, as cis-iso-humulonas são conhecidas como principais responsáveis pelo gosto amargo da bebida, sendo mais amargas que as trans-iso-humulonas, para fins complementares, é sabido que a unidade internacional de amargor (do inglês “International Bitterness Units” ou IBU) é dada por: 1 IBU é equivalente a 1 mg de iso- α -ácidos L⁻¹ de cerveja (DURELLOA, *et al.*, 2019).

Entretanto, pouco se encontra desses α -ácidos no produto final, isso porque quando adicionado a caldeira do mosto cada composto forma um composto iso correspondente, produto do processo de isomerização destes compostos provenientes das resinas. Sabendo-se que a humulona é o principal α -ácido das resinas macias, destaca-se como seus respectivos compostos iso correspondentes (iso- α -ácido ou iso-humulonas) cinco humulonas análogas, postos em ordem decrescente de contribuição para a fração, sendo eles: humulona (35-70% do total de α -ácidos), a cohumulona (20-55%), a adhumulona (10-15%), a prehumulona (1-10%) e a poshumulona (1-3%) (DURELLOA, *et al.*, 2019). Estes compostos iso correspondentes da Humulona são principais α -ácidos do lúpulo, e têm suas estruturas postas abaixo.

Figura 1: Estruturas químicas dos principais α -ácidos (humulonas) do lúpulo.



Fonte: Adaptado de Durello *et al.* (2019).

A fração- β é composta por β -ácidos e resinas moles não caracterizadas, similarmente a divisão da fração exposta anteriormente, o grupo de β -ácidos é composto pela lupulona, a qual se é atribuída característica de amargor e ações antimicrobianas, e quatro compostos iso correspondentes: colupulona, adlupulona, prelupulona e poslupulona. Este grupo também

apresenta baixa solubilidade em água, em decorrência disso, somente traços dos β -ácidos são encontrados no produto final (ALMAGUER, *et al.*, 2014).

Os voláteis do lúpulo, conhecidos como óleo essencial de lúpulo (0,5-3,0% do peso dos cones secos), definidos como metabólitos secundários secretados nas glândulas de lupulina da flor do lúpulo, são centenas de complexos compostos biossintetizados, como terpenos, hidrocarbonetos, terpenóides, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas, responsáveis pelo aroma de lúpulo característico de alguns estilos de cerveja. Essas características aromáticas desses compostos são definidas por características como a quantidade adicionada, o tipo de lúpulo e o tempo de dosagem. Ao adicionar-se a planta no começo do processo de fervura, visa-se a conversão da parte ácida das resinas em seus respectivos iso compostos, assim, grande parte dos óleos é volatilizada visando características de amargor da bebida. Contraposto a isso, cervejas que buscam manter características aromáticas são submetidas a uma lupulagem tardia, ou ainda uma segunda lupulagem, como é o caso do *dry hopping*. Assim, em temperaturas menores, esses compostos conseguem ser retidos, evitando sua volatilização (RETTBERG, *et al.*, 2018).

A técnica de DH é conhecida por ser empregada em temperaturas mais baixas que a de fermentação, com a intenção de transferir componentes específicos de aroma para a cerveja, assim, essa transferência é feita com perdas baixas de compostos (sem evaporação) e menos influência de leveduras, em decorrência da falta de carga térmica (FOSTER e GAHR, 2013).

Entretanto essa extração retém mais compostos na bebida, mas apresenta uma extração menos efetiva, em consequência dessa temperatura mais baixa. Recentemente, algumas microcervejarias têm adicionado terpenos puros em cervejas para intensificar o aroma de lúpulo. Entretanto, não há informação da adição de OE do lúpulo, extraído previamente de forma mais efetiva, à bebida após a fermentação ou antes do envase.

2.4 Óleo Essencial de Lúpulo

A extração de óleos essenciais pode ser feita por hidrodestilação, a destilação por arraste a vapor, a extração por solventes orgânicos, a extração com fluido supercrítico e etc. Dentre os métodos para isolar os óleos essenciais, os mais amplamente utilizados são a destilação a vapor e a extração com solventes (BUSATO, *et al.*, 2014). Tal extração tende a gerar um bom rendimento de produtos.

Como dito, o óleo essencial de lúpulo é uma complexa mistura de compostos, destacando-se nesse momento a classe de terpenos e terpenóides. Essas estruturas são compostas por unidades de isopreno (C_5H_8), onde compostos com duas unidades de isopreno são chamados de monoterpenos, e compostos com três unidades de isopreno são sesquiterpenos. Terpenos que contêm oxigênio são chamados de terpenóides. Assim, a fração desses hidrocarbonetos representa 80-90% do conteúdo total dos OE de lúpulo (FELIPE E BICAS, 2017).

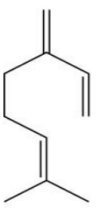
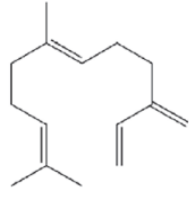
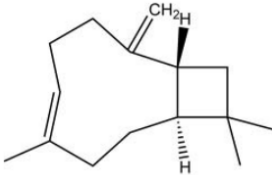
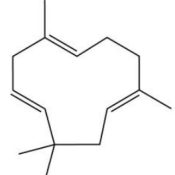
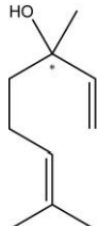
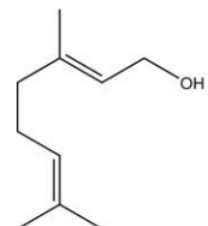
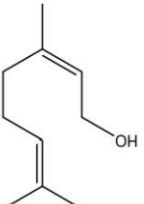

O Mirceno, mais especificamente o β -Mirceno, é o monoterpeno mais importante e abundante dentre os hidrocarbonetos presentes no lúpulo (30-60% do conteúdo total dos OE), responsável pelo cheiro pungente presente no lúpulo fresco. Entretanto, quando adicionado à bebida pronta confere aroma resinoso, cítrico, picante e herbáceo. Já o grupo dos sesquiterpenos pode ser representado pelos compostos majoritariamente encontrados: Humuleno, Cariofileno e Farseno (este último encontrado em só algumas variedades de lúpulo). Não obstante, compostos como o Germacreno e o Cadineno também podem ser encontrados entre os sesquiterpenos (ALMAGUER, *et al.*, 2014).

O Humuleno, mais especificamente o α -humuleno, é o sesquiterpeno mais abundante, com composição variando de 8 - 33% da composição total do OE de lúpulo, e a ele é conferido aromas amadeirado e picante, bem como outro sesquiterpeno, o Cariofileno. Por fim, ao Farseno (0-12% do conteúdo total do OE) é atribuído notas de floral, amadeirado e cítrico doce (SHARPE E LAWS, 1981; HIERONYMUS, 2012).

Entretanto, no produto final normalmente encontram-se produtos de oxidação desses terpenos, mas raramente sua forma original. Por exemplo, a autooxidação do Mirceno é responsável por gerar múltiplos produtos de reações cíclicas, como α -Pineno e β -Pineno, dentre outros, e terpenóides como Linalol, Nerol, Geraniol, Citral, α -Terpineol e etc. Também é muito comum a presença de terpenóides em decorrência de reações secundárias, como oxidação do ar e hidrólise de ésteres (RETTBERG, *et al.*, 2018).

Esses compostos podem ser encontrados na forma de diferentes isômeros, compostos de mesma composição química, alterando-se a posição da ligação dupla ou a conformação de alguns radicais. Na Figura 2 é possível encontrar as estruturas químicas de alguns desses terpenos representadas abaixo:

Figura 2: Estrutura química de terpenos e terpenóides.

Monoterpeno	Sesquiterpenos		
			
Mirceno	Farseno	Cariofileno	Humuleno
Terpenóides			
			
Linalol	Geraniol	Nerol	α -Pineno

Fonte: Adaptado Rettberg *et al.*, (2018) e Almaguer *et al.* (2014).

A fração de compostos oxigenados presentes no OE de lúpulo contempla álcoois, aldeídos, ácidos, cetonas, éteres e epóxidos. Estes compostos apresentam alta solubilidade em água, quando comparados a fração de hidrocarbonetos, em concordância, é atribuído altos valores de impacto causados por estes compostos no aroma da bebida, sendo o 2-metil-1-butanol e o linalol tidos os principais constituintes da fração alcoólica (RUTNIK *et al.*, 2021).

2.5 Microextração em fase sólida (SPME) e Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

A extração de compostos voláteis pode ser feita pela técnica SPME, que consiste no uso de uma fibra de sílica fundida recoberta com material polimérico (polidimetilsiloxano = PDMS, poliacrilato = PA ou Carbowax = Cwx) ou sólido adsorvente (carvão ativo

microparticulado = Carboxen). Nessa técnica a extração ocorre por meio de processos de sorção (absorção ou adsorção) do analito em uma fina camada de fase extratora, polímero ou sólido adsorvente, que reveste a superfície externa da fibra de sílica fundida (VALENTE E AUGUSTO, 2000; TOFFOLI E LANÇAS, 2016).

A extração fundamenta-se no equilíbrio de partição (PDMS) ou adsorção (Carboxen) dos analitos entre a fibra e a amostra ou seu headspace, para extração direta e indireta, respectivamente. Desta forma, no momento em que o equilíbrio é alcançado a quantidade de composto extraído é proporcional ao fator de retenção da fase da fibra e a sua concentração na amostra, assim, os compostos são posteriormente dessorvidos termicamente, separados, identificados e quantificados. A eficiência da extração é influenciada pelas características físico-químicas da fase, que deve ser compatível com a polaridade dos analitos, e pela espessura da fase extratora, a qual é responsável por reter os analitos (MATA *et al.*, 2004).

Dentre as vantagens da SPME, destacam-se que não necessita de solvente, opera com menores volumes de amostra, tem elevado poder de concentração, 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).

Essa técnica pode ser aliada a técnicas analíticas, como a SPME/GC, desta forma a fibra é inserida diretamente no injetor já aquecido após o processo de extração, onde os analitos serão termicamente dessorvidos para a coluna analítica. Assim, pode-se ter análises rápidas, com baixo consumo de solventes tóxicos e com maior precisão analítica (TOFFOLI E LANÇAS, 2016).

A GC é uma ferramenta amplamente utilizada para análises qualitativas e quantitativas. Fundamenta-se na separação de componentes de uma amostra através da distribuição dos mesmos entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida mantida em uma coluna. Para isso, a amostra é injetada no cromatógrafo, vaporizada e transferida para a coluna cromatográfica, passando por posterior eluição pelo fluxo de uma fase móvel gasosa inerte (gás de arraste) que pode ser constituída de He, N₂, Ar ou H₂. Por fim, alguns pontos críticos demandam atenção para garantir a reprodutibilidade das amostras, como temperatura controlada, podendo haver uma programação de temperatura para que haja melhor separação dos compostos de uma amostra, ou ainda escolher uma coluna cromatográfica que tenha

afinidade com o analito, aumentando a retenção e seletividade (HARRIS, 2012; SKOOG *et al.*, 2006).

Após a separação dos compostos ao longo da coluna cromatográfica, as moléculas dos analitos são introduzidas num espectrômetro de massas, ocorrendo formação de íons em fase gasosa por meio de fontes de ionização energética. Por fim, os íons são separados com base na razão massa-carga(m/z). No sistema GC-MS, o espectrômetro de massas varre as massas repetidamente durante a corrida cromatográfica, e a abundância do íon em cada espectro pode ser somada e colocada em um gráfico em função do tempo para fornecer um cromatograma (SKOOG *et al.*, 2006).

2.6 Quimiometria

O uso de processamento de dados quimiométricos está se tornando uma parte importante da cromatografia moderna, isso porque essa ferramenta possibilita o processamento de um grande número de dados, como é o caso dos dados cromatográficos. Ao se analisar informações químicas de múltiplas naturezas deve-se reduzir a variedade de variáveis, ocorrendo-se perda de dados, visto que se feita por um operador pode se dar de forma subjetiva, por meio da intuição química ou da experiência (NETO E MOITA, 1997; NIELSEN *et al.*, 1998).

A quimiometria reúne conhecimentos matemáticos e estatísticos aplicados ao campo da química, e através de técnicas de estatística multivariada complementares bem aceitas pelos químicos, viabiliza a construção de gráficos que contém maiores informações estatísticas, o que é o caso da análise de componentes principais (PCA), um método não supervisionado que reescreve as coordenadas das amostras em outro sistema de eixo mais conveniente para a análise em questão (NETO E MOITA, 1997).

A PCA é um método poderoso e versátil capaz de fornecer uma visão geral de dados complexos e multivariados. Pode ser usada para revelar relações entre variáveis e relações entre amostras (por exemplo, agrupamento), detectar outliers, encontrar e quantificar padrões, gerar novas hipóteses e muitas outras possibilidades, como o emprego associado a outras técnicas quimiométricas (BRO E SMILDE, 2014). Dessa forma, ao aplicar a PCA em dados cromatográficos referentes ao perfil volátil de cervejas, torna-se possível verificar semelhanças e diferenças entre as amostras a partir da distribuição das mesmas em um gráfico

bidimensional, verificando ainda os compostos (variáveis) responsáveis pela distribuição observada.

3. METODOLOGIA

3.1 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;

3.2 Amostras

As amostras de cerveja *American Pale Ale* (APA) foram obtidas com um produtor caseiro local de cerveja artesanal. O processo de brasagem e de fermentação foi realizado com 27 L de mosto, sendo que ao final da fermentação 2 L da cerveja foram transferidos para um fermentador de plástico de 3 L. No fermentador inicial que continha 25 L de cerveja foi realizado o processo de *dry hopping*, sendo adicionado 125 g (5 g L^{-1}) de lúpulo *Columbus* em *pellets* durante cinco dias. No fermentador que continha 2 L de cerveja foram adicionados 130 μl do OE do lúpulo *Columbus* (volume de óleo equivalente à massa de 10 g de lúpulo). Após 5 dias, as amostras foram transferidas para barris de inox e carbonatadas com $\text{CO}_{2(g)}$ por 5 dias à 1 atm. Duas garrafas de 600 mL de cada cerveja foram armazenadas em geladeira a 4C° até o momento da análise, quando foram analisadas em duplicata.

A extração do óleo essencial ocorreu por meio da hidrodestilação de 100g de lúpulo por 4h. O óleo foi separado do hidrolato e armazenado em atmosfera de nitrogênio à -13C° até a data da análise.

3.3 Análise por SPME-GC-MS

5 mL das amostras de cerveja foram transferidos para um vial de vidro de 20 mL selado com tampa de septo de silicone, específico para extração por SPME através do *headspace*. Previamente à extração, foram adicionados 1 g de NaCl em cada vial. As amostras foram analisadas imediatamente após as garrafas serem abertas, sem a eliminação do CO_2 .

Efetuuou-se a extração dos compostos com uma fibra de PDMS/DVB/CAR à 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 e com coluna de gás hélio à 1 mL/min, disponível na Central 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 móvel foi gás hélio à 1 mL/min. A programação da temperatura do forno cromatográfico para a análise das amostras de cerveja iniciou em 40°C, aumentando 3°C/min até 160°C, com posterior acréscimo de 20°C/min até 260°C, mantendo constante por 2 minutos, totalizando 47 minutos de corrida. Para a análise do óleo essencial foi injetado 1 µL do óleo essencial diluído 50 vezes em diclorometano, no modo *split* 1:20 e a programação da temperatura foi de 60°C até 240°C à 3 °C/min, com 3 min de corte de solvente.

A manipulação do OE não foi realizada pela autora, bem como a injeção das amostras, realizadas pela Doutoranda Letícia Fagundes, coorientadora do presente trabalho.

O espectrômetro de massas foi operado no modo *scan* na faixa de 40 e 350 m/z, sob temperatura de interface de 240°C e a temperatura da fonte de íons em 200°C. A sensibilidade do detector e os parâmetros do MS foram calibradas automaticamente de acordo com o *auto tuning* do equipamento.

3.4 Identificação dos compostos/Processamento de dados

Através do software AMDIS (do inglês, Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System), e a partir da comparação dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca NIST (do inglês, National Institute of Standards and Technology), ponderando valores de *match* (similaridade) mínimos de 800, foi possível a identificação dos compostos separados previamente. Juntamente foi utilizado também os índices de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI), considerando os tempos de retenção de uma mistura de n-alcenos como referência, nas mesmas condições das análises das amostras. O livro “Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry”, do Dr Robert P. Adams, edição 4.1 (2017), também foi utilizado para consulta dos índices de retenção.

3.5 Análise quimiométrica

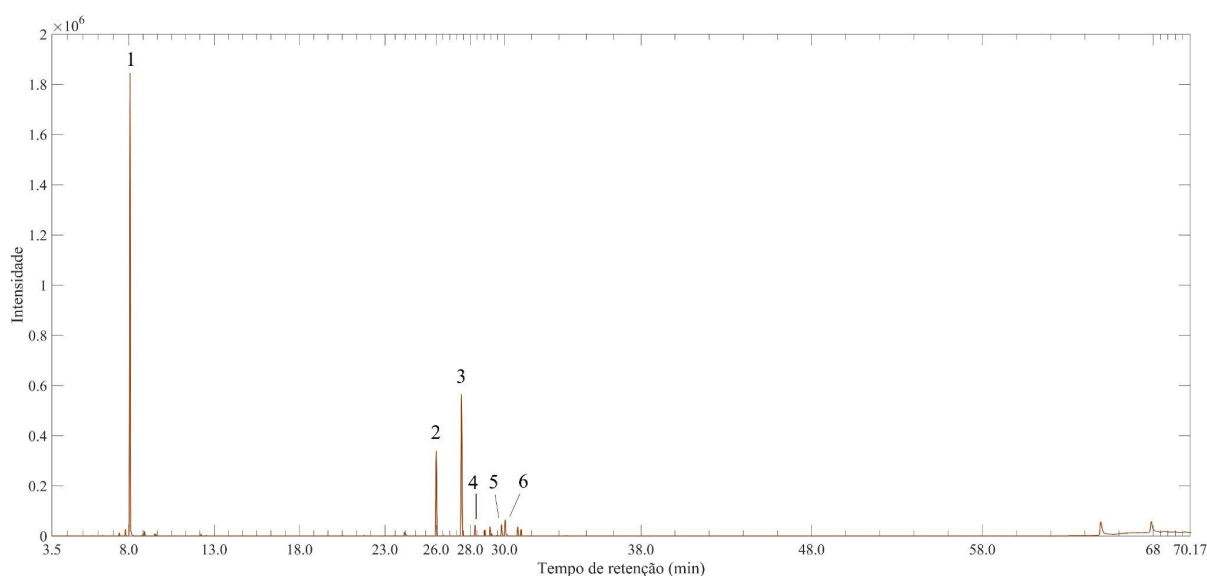
Os cromatogramas das amostras de cerveja foram salvos em formato *net.cdf* e exportados para o software MATLAB[®] (*The Mathworks Inc.*), onde extraiu-se os cromatogramas de íons totais. Posteriormente, todos os cromatogramas das amostras foram sobrepostos, obtendo-se uma matriz 8x8000. Os cromatogramas foram alinhados 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 **X**, que consistiu em uma matriz que abrangia todos os cromatogramas sobrepostos. Nenhum outro pré-processamento foi realizado.

Para a realização da PCA utilizou-se o software Chemoface obtendo-se gráficos de *scores* e *loadings*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O óleo essencial do lúpulo contém inúmeros componentes químicos voláteis que influenciam no perfil aromático da cerveja, sendo os mais importantes destacados anteriormente. O lúpulo comercializado e usado neste trabalho apresenta em seu rótulo a identificação e a porcentagem aproximada dos compostos mais importantes em na constituição de seu óleo essencial, conforme apresentado anteriormente. Contudo, diversos compostos minoritários podem estar presentes no óleo e, por isso, se faz necessária a análise cromatográfica do OE empregado neste estudo para verificar se esses compostos estão presentes na cerveja na qual ele foi adicionado. Visto isso, realizou-se a análise por GC-MS do OE do lúpulo *Columbus*, a fim de identificar compostos presentes nesta variedade, sendo obtido o cromatograma ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Cromatograma da amostra de OE do lúpulo *Columbus*.



Fonte: Da autora (2022).

Na Tabela 1 é possível visualizar os compostos identificados no OE, os quais foram numerados de acordo com seus respectivos tempos de retenção no cromatograma, além do nome dos compostos, o tempo de retenção, os índices de retenção (IR) teóricos e experimentais e, também, os valores do *Match*.

Tabela 1: Compostos identificados nas amostras de OE do lúpulo *Columbus*.

Picos	Nome	Tempo de retenção (min)	IR Experimental	IR Teórico	Match	Área relativa (%)
1	α -mirceno	8,06	988	991	944	45,5
2	β -cariofileno	26,00	1420	1418	951	15,0
3	α -humuleno	27,48	1456	1452	943	26,1
4	Germacreno D	28,28	1475	1480	822	2,1
5	γ -cadineno	29,83	1513	1513	816	2,2
6	δ -cadineno	30,04	1519	1522	833	3,3

Fonte: Da autora (2022).

A variedade de lúpulo *Columbus* apresenta notas de casca de laranja, baunilha, capim limão e picante, é um lúpulo utilizado quando se almeja características de amargor e aroma na bebida. Essa variedade apresenta de 15 - 17% de α -ácidos e 2,5 - 3,5 ml de óleo essencial em 100 g de lúpulo seco, sendo que o mirceno representa 50 - 60% dos óleos totais, enquanto o humuleno representa 12 - 18%, o cariofileno 9,0 - 11,0% e farneseno geralmente está presente em quantidades menores do que 1% (BREWHOUSE, 2022). Tal informação se reafirma com os compostos identificados, sendo que a porcentagem de área obtida está de acordo com aquela descrita no rótulo do lúpulo. O mirceno é o composto mais abundante no OE de lúpulo (1), e como esperado, seu pico é o maior apresentado no cromatograma. Este monoterpene tem características aromáticas que remetem a aroma resinoso, cítrico, picante e herbáceo, condizente com a variedade utilizada.

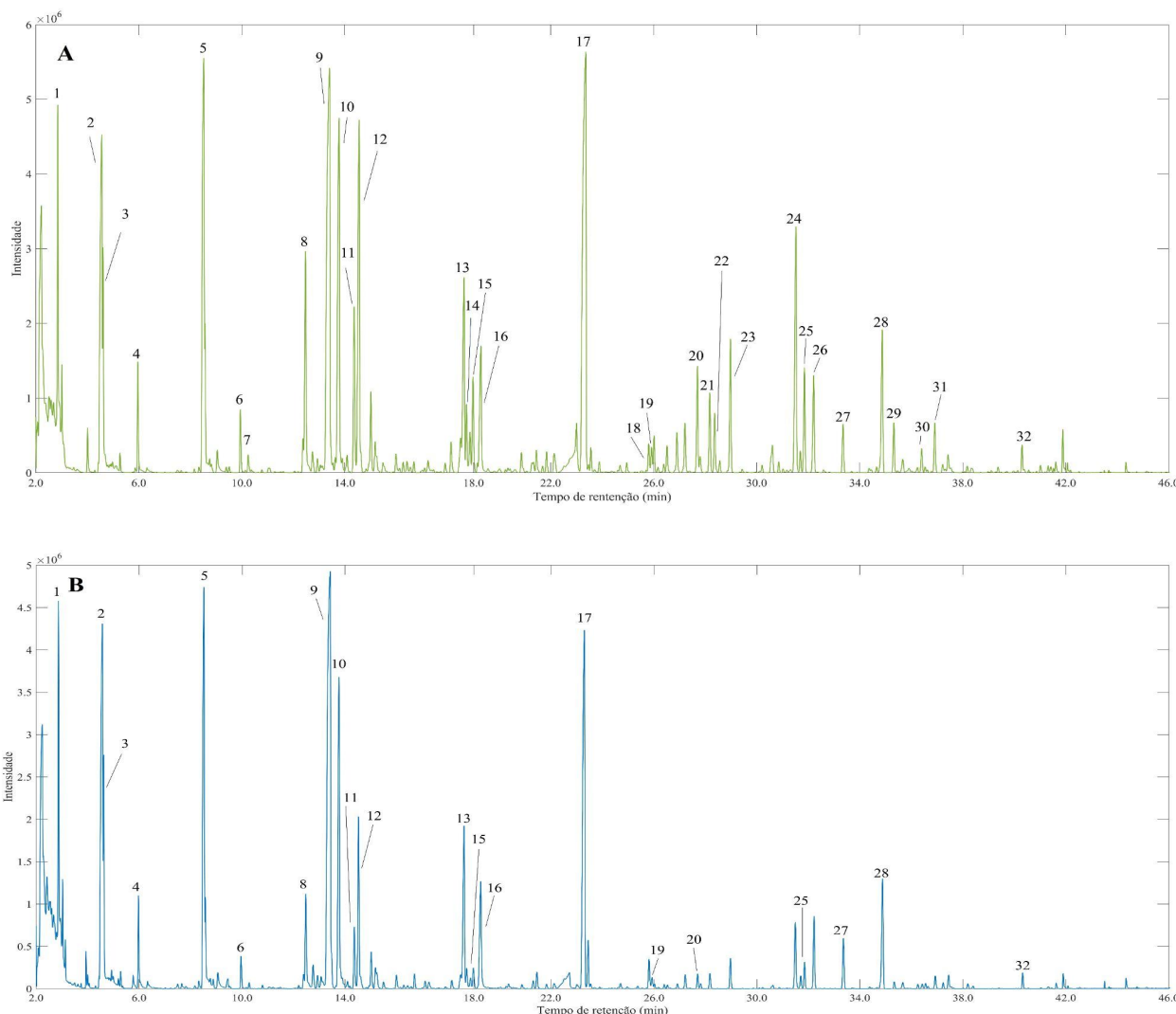
Como esperado, e em acordo com Almaguer *et al.* 2014, grande parte do material é contabilizado em picos, sendo o primeiro relativo ao mirceno, seguido pelo β -cariofileno (2), que elui muito mais tarde, e logo depois aparece o pico do α -humuleno (3), ambos apresentam contribuições condizentes com o esperado pela variedade de lúpulo utilizada, e são conhecidos por

apresentarem odores amadeirados e apimentados. O composto α -humuleno também apresentou possível identificação como o α -cariofileno, entretanto, de acordo com Sharpe e Laws (1981), ambos os compostos são isômeros.

Quando presentes na cerveja, estes compostos reagem com outros presentes na bebida, se degradando ou resultando na formação de outros compostos, como álcoois, óxidos ou epóxidos, que também são tidos como importantes para a construção do perfil aromático da bebida.

Desta forma, analisou-se cervejas que passaram pela adição de OE e cervejas que passaram pelo processo de DH. Sabe-se que durante o DH o lúpulo fica por alguns dias em contato com a bebida, realizando uma extração lenta dos compostos do OE. Essa etapa não é tão efetiva para a extração dos terpenos, sendo que boa parte dos compostos do óleo essencial permanecem no lúpulo após o DH. De maneira comparativa, a adição direta do OE na cerveja tende, em teoria, a aumentar a quantidade desses compostos na amostra final de cerveja, visto que os terpenos foram extraídos exaustivamente dos *pellets* do lúpulo durante a hidrodestilação. Assim, as bebidas produzidas das duas formas foram analisadas por SPME-GC-MS com o intuito de identificar o perfil aromático das mesmas e realizar comparações entre as formas de lupulagem. O cromatograma da amostra submetida a adição de OE e o cromatograma da amostra submetida ao DH estão mostrados a seguir (Figura 4 A e B).

Figura 4: Cromatograma das amostras de cerveja submetida a adição de OE (Fig. 4A) e submetidas ao DH (Fig. 4B)



Fonte: Da autora (2022).

A partir da comparação visual dos cromatogramas da cerveja com OE e da cerveja que passou pelo DH é possível perceber que, praticamente, os mesmos compostos estão presentes nas duas amostras analisadas, sendo que apenas a variação da intensidade de alguns compostos que varia de uma amostra para outra. Em seguida, foi realizada a identificação dos compostos e, posteriormente, foi discutida sua contribuição na análise quimiométrica. A Tabela 2 abaixo reúne quais compostos foram identificados de forma numerada de acordo com seus respectivos tempos de retenção no cromatograma, como o nome dos compostos, o tempo de retenção, os índices de retenção (IR) teóricos e experimentais e, também, os valores do Match, bem como a importância

desses compostos na PCA (peso positivo na PC2 (+), negativo na PC2 (-), ou não importante na PC2(X)). As informações relacionadas à análise quimiométrica serão discutidas posteriormente.

Tabela 2: Compostos identificados nas amostras de cervejas empregadas no estudo. (continua)

Picos	Nome	Tempo de retenção (min)	IR Experimental	IR Teórico	Match	Loadings da PCA
1	Acetato de etila	2,84	603	606	924	+
2	Álcool isoamílico	4,55	731	724	893	+
3	2-metil-1-butanol	4,60	734	724	892	X
4	Butanoato de etila	5,94	799	802	953	X
5	Acetato de Isoamila	8,52	874	869	933	-
6	2-metil propanoato de 2-metilpropila	9,95	912	908	942	X
7	2-metil-4-Heptanona	10,25	919	918	934	X
8	Propanoato de 2-metil-1-butanol	12,47	970	961	931	-
9	α -mirceno*	13,39	991	991	930	+
10	Hexanoato de etila	13,77	1000	997	938	X
11	Isobutirato de isopentila	14,35	1011	1007	925	X
12	Isobutirato de 2-metilbutila	14,55	1015	1014	950	-

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

Fonte: Da autora (2022).

Tabela 2: Compostos identificados nas amostras de cervejas empregadas no estudo. (continua)

Picos	Nome	Tempo de retenção (min)	IR Experi mental	IR Teórico	Match	Loadings da PCA
13	Linalol*	18,62	1096	1095	902	-
14	2-metilbutanoato de 2-metilbutila	18,72	1098	1100	939	X
15	Isovalerato de 2-metilbutila	18,97	1103	1103	937	-
16	Álcool fenético	19,28	1110	1107	953	X
17	Octanoato de etila	23,35	1194	1196	918	-
18	Geraniol*	25,80	1246	1249	895	X
19	Acetato de fenetila	25,91	1248	1254	953	X
20	2-Undecanona	27,69	1286	1291	947	-
21	2-Undecanol	28,17	1296	1301	895	X
22	4-decenoato de metila	28,36	1300	-	937	X
23	Geranato de metila*	28,98	1315	1322	931	-
24	Acetato de geranila*	31,52	1376	1379	921	-
25	9-decenoato de etila	31,85	1384	1386	864	X
26	Decanoato de etila	32,21	1392	1395	897	+
27	Cariofileno*	33,34	1419	1417	960	+

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

Fonte: Da autora (2022).

Tabela 2: Compostos identificados nas amostras de cervejas empregadas no estudo. (conclusão)

Picos	Nome	Tempo de retenção (min)	IR Experimental	IR Teórico	Match	Loadings da PCA
28	α -Humuleno*	34,87	1457	1454	955	+
29	Propionato de geranila*	35,32	1467	1476	866	-
30	2-Tridecanona	36,40	1494	1491	918	X
31	Butirato de Geranila *	36,91	1506	1562	933	X
32	Dodecanoato de etila	40,30	1594	1594	898	X

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

Fonte: Da autora (2022).

É possível identificar substâncias voláteis presentes nas amostras de cerveja pertencentes às classes de ésteres, álcoois e terpenos, que são compostos desejáveis à qualidade da bebida em decorrência de conferir aromas característicos. Álcoois superiores são gerados por anabolismo ou catabolismo de aminoácidos pela via de Ehrlich, enquanto ésteres podem ser formados pela condensação enzimática de ácidos orgânicos e álcoois. Entretanto, a formação de ambos está fortemente ligada à etapa de fermentação e à ação das leveduras. Muitos dos ésteres presentes apresentam aromas doces e/ou frutados, como o acetato de isoamila (5) que confere odores “frutado” e “banana”, o acetato de feniletila (19) que apresenta aromas de rosas e mel, acetato de etila (1) (solvente, frutado), hexanoato de etila (10) (maçã, frutado) e octanoato de etila (17) (maçã, anis). Alguns álcoois são destacados com a mesma função, como o álcool isoamílico (2) (alcoólico, banana) identificado (PIRES *et al.*, 2014; ALVES *et al.*, 2020).

O butanoato de etila (4) é conhecido por seu valor como aromatizante na indústria alimentícia, naturalmente encontrado em muitos alimentos e bebidas fermentadas, como cervejas e vinhos. Tal composto é produto da esterificação do ácido butanóico e do etanol, sendo a sua concentração variante em dependência da fonte e da composição da cultura microbiana inicial (XU *et al.*, 2020).

Outros componentes como 2-metil-1-butanol (3), 2-undecanol (21), decanoato de etila (26), dodecanoato de etila (laurato de etila) (32) e 2-undecanona (20) também são considerados como limiares de sabor relacionados a cerveja (TAN; SIEBERT; 2004), originados em sua maior parte na fermentação, podendo alguns destes compostos, como 2-metil-1-butanol e 2-undecanona, serem encontrados na fração oxigenada do OE de lúpulo. (RUTNIK *et al.*, 2021)

Contudo, os compostos que são reconhecidos como responsáveis por características organolépticas da bebida estão presentes principalmente no lúpulo, adicionado trivialmente na etapa de fervura, como visto. O mirceno (9) é o mais abundante, e sua auto-oxidação origina vários produtos de reação cíclica, como α -pineno e β -pineno, dentre outros, e também forma terpenóides como linalol (13), nerol, geraniol (18) e etc. Estes compostos oxigenados derivados do mirceno são os compostos de fato encontrados no produto final, visto que o próprio mirceno é parcialmente evaporado durante a fervura do mosto (RETTBERG *et al.*, 2018).

Visando características finais da bebida, destacam-se dentre os terpenóides relevantes os álcoois monoterpênicos, como o linalol, geraniol, e seus isômeros, nerol e α -terpineol. Complementarmente, os principais ésteres presentes no OE de lúpulo são ésteres acetato de geranila (24), propionato de geranila (29) e butirato de geranila (31) (RETTBERG *et al.*, 2018; DIETZ *et al.*, 2021).

De acordo com Kaltner and Mitter (2006), diferentes concentrações de linalol apresentam modificações na percepção de amargor da bebida. Deste modo, classificações como “harmonia de amargor” aumentaram para cervejas com a maior concentração de linalol, isso significa que, cervejas com alta concentração de hidrocarbonetos terpênicos e baixa concentração de linalol apresentaram altas classificações como “harmonioso, mas apresenta amargor crescente”, e poucas classificações de “amargor suave”. Entretanto, o linalol é destacado por atuar como uma molécula que melhora o aroma/sabor de certas misturas voláteis, visto que quando aplicado individualmente não apresenta grande impacto no perfil sensorial da cerveja (DIETZ *et al.*, 2021). Os ésteres de geranila, provenientes da esterificação de ácidos carboxílicos derivados do lúpulo ou por transesterificação, estão associados a produtos que apresentam um amargor suave, e apresentam um aumento da percepção de doçura na bebida (DIETZ *et al.*, 2021).

Já a fração picante do lúpulo é identificada em sua grande parte como produtos de oxidação do α -humuleno (28) ou β -cariofileno (27), visto também que estes compostos por si só já apresentam odores amadeirados e apimentados, bem como são representantes majoritários do grupo dos sesquiterpenos, logo, a identificação dos mesmos é esperada.

Os compostos isômeros do cadineno identificados no OE puro não foram encontrados nas amostras, o que pode acontecer pelo fato das áreas dos picos identificados serem pequenas, o que implica em uma baixa concentração desses compostos em solução. Logo, ao longo do processo esses compostos podem ter sido oxidados a compostos com concentrações ainda menores, dificultando ou impossibilitando a identificação.

Alguns compostos foram identificados nas amostras com OE mas não identificados nas de DH, como: 2-metil-4-Heptanona (7), 2-metilbutanoato de 2-metilbutila (14), Geraniol (18), 2-undecanol (21), 4-decanoato de metila (22), geranato de metila (23), acetato de geranila (24), decanoato de etila (26), propionato de geranila (29), 2-tridecanona (30) e butirato de geranila (31). Estes compostos não identificados podem não estar presentes, ou podem estar presentes em quantidades não significativas, dificultando ou impossibilitando a identificação. Tal grupo apresenta ésteres da fermentação, bem como compostos oxigenados provenientes do lúpulo.

4.2 Análises Quimiométricas

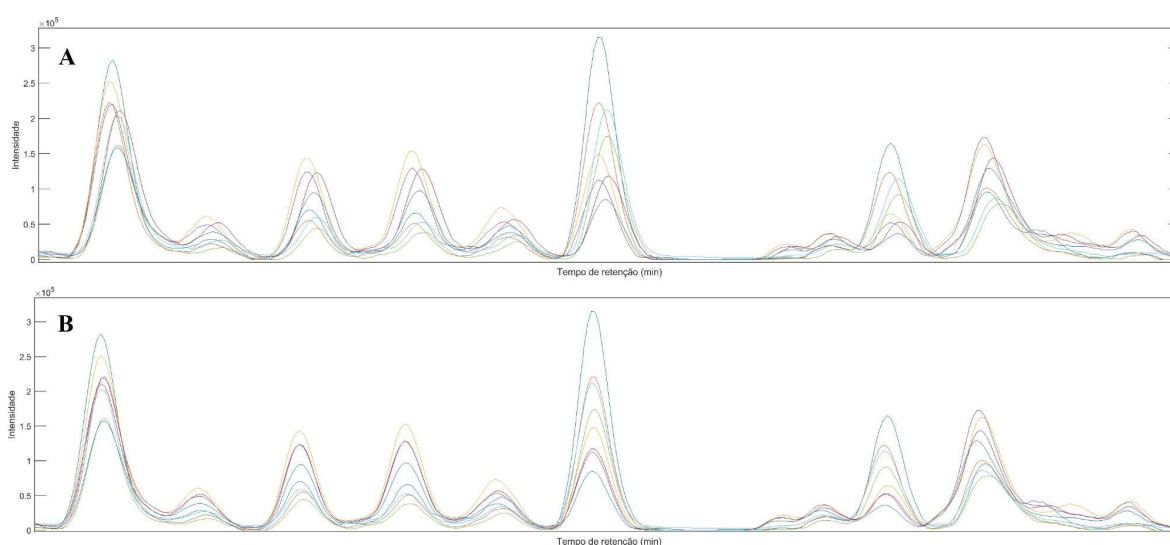
Como visto, um grande número de compostos foram encontrados e identificados na fração volátil de ambas as amostras cervejas por GC-MS, o que agrega uma grande densidade de variáveis numéricas, estatísticas e químicas aos dados gerados, fazendo-se necessário o uso da quimiometria para melhor interpretação dos resultados, buscando a comparação entre as cervejas.

O uso de métodos quimiométricos se deu por meio de *softwares*, pois a averiguação visual é tida como subjetiva, podendo ser inadequada. A determinação da área de picos específicos de compostos presentes no lúpulo também pode ser julgada como inadequada para comparação das cervejas com DH e com OE, pois demandaria selecionar previamente picos relevantes, além de problemas ao integrar corretamente os picos quando não há resolução completa entre eles. O uso dessas ferramentas também se faz necessário considerando que outros compostos, além daqueles característicos do lúpulo, podem variar, podendo estar ou não essa variação atrelada a reações envolvendo componentes do lúpulo. Por isso, o uso do cromatograma completo, na forma de vetor, foi usado nas análises quimiométricas, visto que leva em consideração a variação de todos os picos do cromatograma.

Entretanto, sobrepondo-se os cromatogramas foi possível perceber variações no tempo de retenção de um mesmo composto em várias análises. Com o intuito de contornar essa situação, fez-se o alinhamento dos cromatogramas. Deste modo, ao realizar as análises quimiométricas evita-se que um mesmo composto seja interpretado duas vezes, uma vez que picos equivalentes

em amostras distintas provocam certos erros nas análises quimiométricas quando cada cromatograma é usado como um vetor, e o conjunto de cromatogramas é uma matriz de dado. Um corte próximo a 16 minutos de tempo de retenção foi feito nos cromatogramas sobrepostos antes e depois do alinhamento por meio do algoritmo COW, com o intuito de demonstrar a falta de alinhamento entre amostras para picos correspondentes, o qual está apresentado na figura 5(A), enquanto que o mesmo fragmento dos cromatograma alinhados está mostrado na figura 5(B).

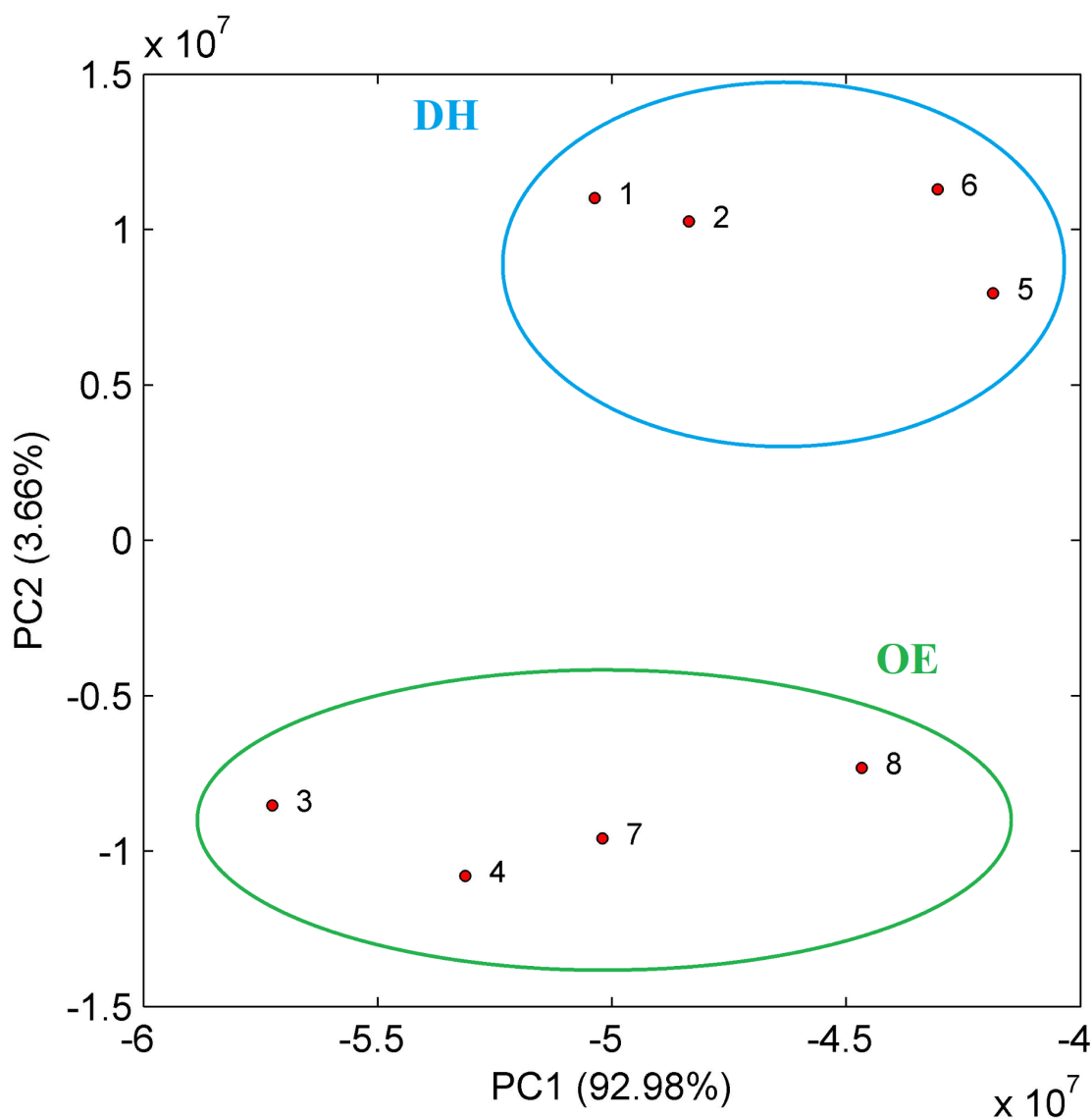
Figura 5: Fragmentos de cromatograma desalinhado (Fig.5A) e alinhado (Fig. 5B)



Fonte: Da autora (2022).

Uma vez que os cromatogramas referentes às amostras de adição de OE e amostras submetidas ao DH passaram pelo processo de alinhamento, foram realizadas operações quimiométricas. Nesse contexto adotou-se a PCA para melhor interpretação dos dados.

Submetendo-se os dados a PCA, foi possível observar separação e/ou agrupamento das amostras no gráfico de *scores* (PC1 x PC2), como exposto na Figura 6, nas quais as amostras 1, 2, 5 e 6 se referem às amostras de DH, enquanto as amostras 3, 4, 7 e 8 se referem às amostras com OE.

Figura 6: Gráfico de *scores* (PC1 X PC2)

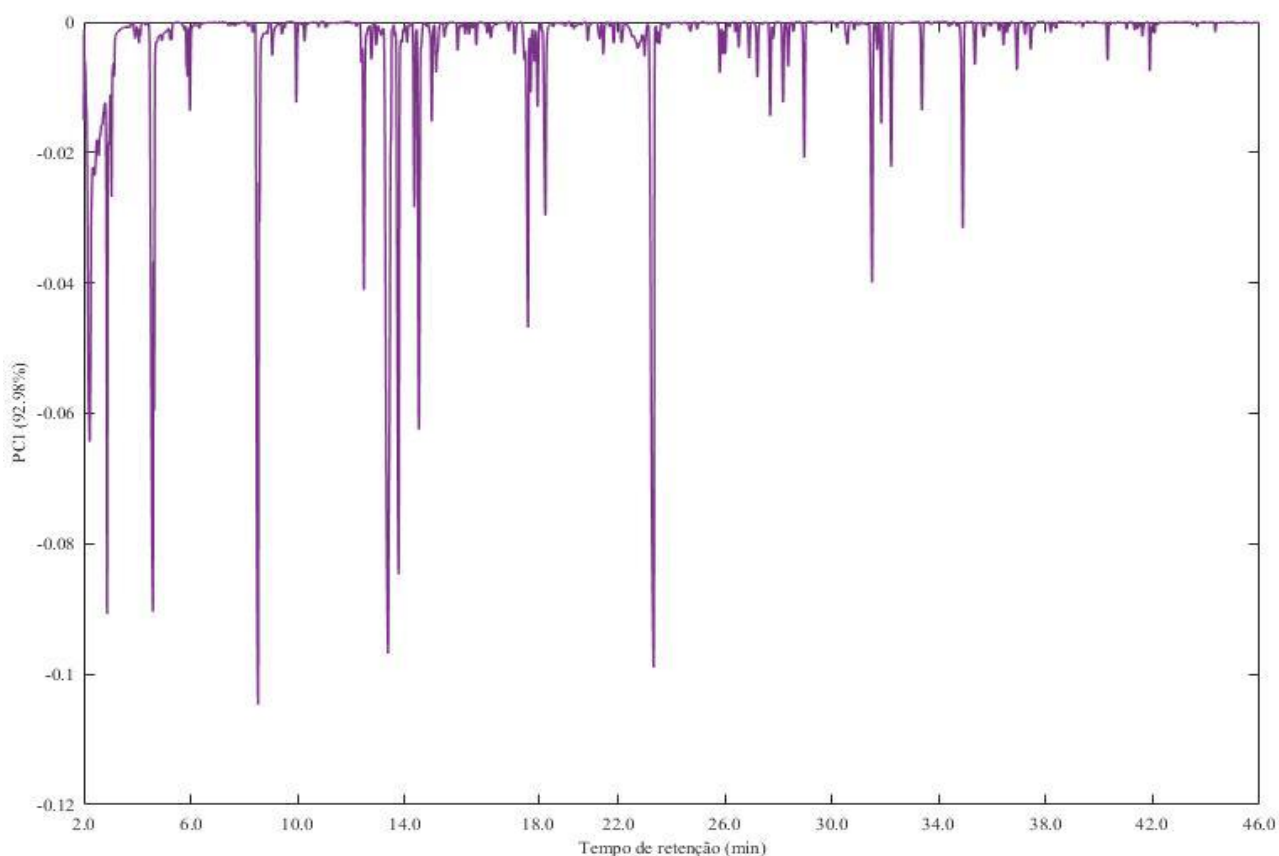
Fonte: Da autora (2022).

Em relação ao gráfico de *scores*, a PC1 descreve 92,98% da variância dos dados, enquanto a PC2 descreve 3,66%. Ao observar-se as amostras, é perceptível que elas estão separadas em PC2 de forma condizente com a forma que o lúpulo foi utilizado, sendo as amostras situadas na parte positiva da PC2 se referem às amostras com DH e as amostras na parte negativa são referentes às amostras com OE. Em complemento, a baixa variância explicada nessa PC também era esperada, visto que diversos compostos voláteis presentes nas

amostras são oriundas das etapas como a etapa de fervura e de fermentação, etapas essas que foram idênticas para ambas as amostras.

A PC1 descreve uma maior porcentagem da variância, sendo referente a maior parte dos compostos que estão presentes em todas as amostras, não havendo separação entre elas nessa componente. Para fins de averiguação tem-se o gráfico de *loadings* da PC1 na Figura 7, entretanto este gráfico apresenta-se de forma similar aos cromatogramas das amostras, postos na Figura 4, desta forma, utilizou-se apenas o gráfico de *loadings* da PC2 para o levantamento de hipóteses e posterior discussão

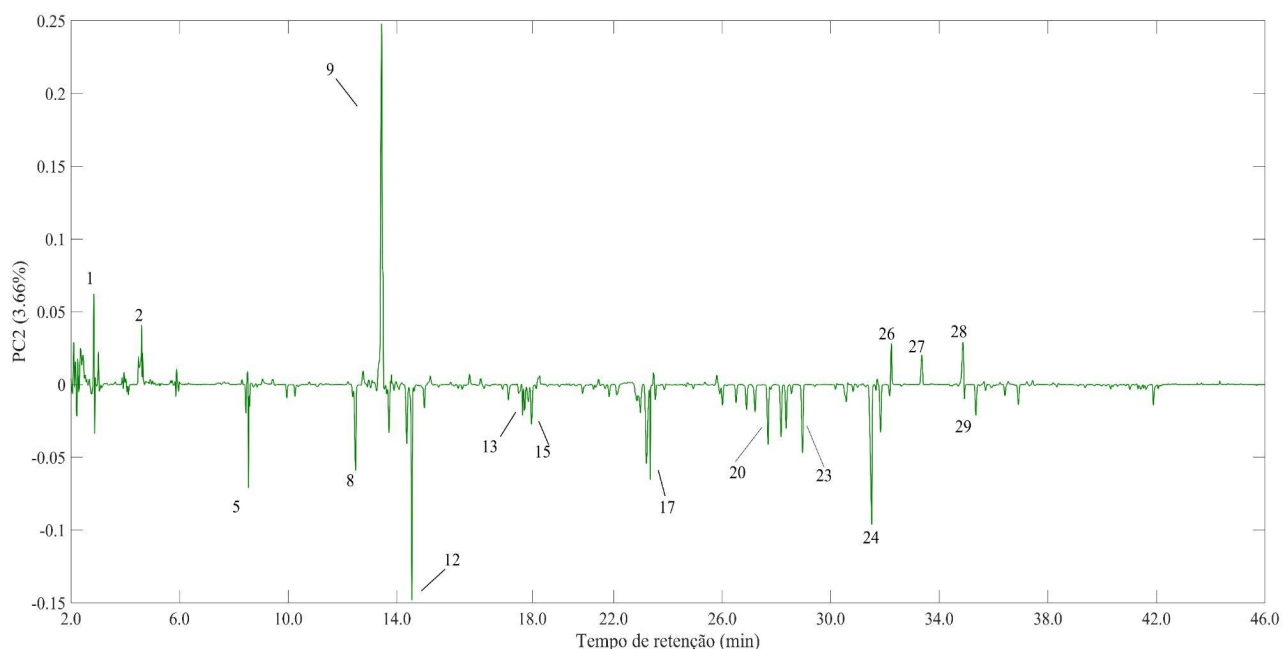
Figura 7: Gráfico de loadings da PC1.



A PC2, por sua vez, é a componente que diferencia as amostras, representando uma pequena parte dos compostos que são divergentes entre amostras ou que apresentam maiores variações de área de pico. Em suma, o gráfico de *scores* separa as amostras em cervejas com DH e cerveja com OE por meio da PC2. A partir disso, obteve-se o gráfico de *loadings* da

PC2, que evidencia compostos importantes para cada grupo de amostras. O gráfico de *loadings* é apresentado na Figura 8.

Figura 8: Gráfico de *loadings* da PC2.



Fonte: Da autora (2022).

O gráfico de *loadings* da PC2 viabiliza a caracterização de tendências entre as variáveis. Assim, de forma análoga à tabela de compostos identificados nas amostras de cervejas empregadas no estudo, os picos que tem peso positivo (DH) na PC2 são: acetato de etila (1), álcool isoamílico (2), mirceno (9), decanoato de etila (26), cariofileno (27) e α -humuleno (28). Referente aos picos que tem peso negativo na PC2 (OE), tem-se: acetato de isoamila (5), propanoato de 2-metil-1-butanol (8), isobutirato de 2-metilbutila (12), linalol (13), isovalerato de 2-metilbutil (15), octanoato de etila (17), 2-undecanona (20), geranato de metila (23), acetato de geranila (24) e propionato de geranila (29), conforme apresentado na Tabela 2.

A partir da Figura 8 é possível verificar que outros compostos, além dos relacionados ao lúpulo, são relevantes para a PC2 e são responsáveis também pelas determinações de tendências entre as amostras de cerveja.

Em decorrência da parte positiva dos *loadings* da PC2 conter maior quantidade de compostos específicos do OE de lúpulo, como o mirceno, o cariofileno e o humuleno, esperava-se o comportamento positivo da PC2 para as amostras de OE e não de DH,

(Almaguer *et al.*, 2014). De maneira similar, a parte negativa dos *loadings* da PC2 esperava-se ser referente às amostras com DH, onde pode-se identificar produtos de oxidação dos OE, como linalol, usualmente presente em cervejas que sofreram DH. Entretanto os resultados se mostram contrários a essa hipótese.

As amostras que sofreram DH apresentaram picos para três compostos da fermentação e maturação (acetato de etila, álcool isoamílico e dodecanoato de etila), e três picos relacionados a terpenos originados do lúpulo (mirceno, β -cariofileno e α -humuleno). Sabe-se que a extração de terpenos é desfavorecida em baixas temperaturas, dessa forma, acredita-se que a extração ocorreu de forma lenta ao longo do período de DH, de modo que quantidades de terpenos fossem extraídas continuamente até o último dia de DH, o que justificaria picos destes hidrocarbonetos presentes no produto final das amostras de DH em maior concentração que na amostra com OE, visto que terpenos recém extraídos ainda não teriam passado por processos oxidativos.

Deve-se considerar que essas amostras apresentaram produtos de oxidação, como por exemplo, o linalol, identificado em seu cromatograma. Entretanto, a contribuição desses compostos nessas amostras foi pouco significativa, fazendo com que não aparecessem no gráfico de *loadings*. Isso pode ser reflexo de reações de oxidação em decorrência do contato com o ar durante a manipulação da cerveja, como também arraste por CO₂ proveniente da fermentação. Em síntese, a extração de forma lenta durante todo DH e processos oxidativos são pontuados como principais responsáveis pelos resultados obtidos, considerando-se o cenário onde esses três terpenos (mirceno, cariofileno e humuleno) são os constituintes majoritariamente encontrados na variedade de lúpulo utilizada (BREWHOUSE, 2022). A extração lenta e contínua fez com que fosse possível encontrar quantidades destes compostos em seus estados originais nas cervejas com DH, enquanto terpenóides são degradados, não demonstrando contribuições significativas para as análises quimiométricas nas cervejas com DH.

Em relação aos compostos provenientes da maturação, sabe-se que ao decorrer do período de armazenagem podem ocorrer reações paralelas. Ésteres e álcoois superiores são biossintetizados na fermentação por esterificação, entretanto a quantidade desses compostos encontrada no produto final depende de reações paralelas de oxidação, isomerização, ou ainda hidrólise do éster (BRODKORB, *et al.*, 2010). Desse modo, a presença destes ésteres e

álcoois no produto final estaria relacionada ao equilíbrio químico dessas reações paralelas, considerando a influência de ésteres e álcoois do lúpulo (terpenóides), que podem deslocar o equilíbrio (VANDERHAEGEN, *et al.*, 2003).

Já nos picos referentes a parte negativa da PC2 podemos encontrar ésteres da fermentação, como é o caso do acetato de isoamila (6), do propanoato de 2-metil-1-butanol, isobutirato de 2-metilbutila (16) e octanoato de etila (18). Além desses compostos, também são encontrados ésteres relacionados a reações de oxidação de compostos do lúpulo, como geranato de metila (24), acetato de geraniol (26) e propionato de geranila (31), que podem estar deslocando o equilíbrio de ésteres da solução. Não suficiente, é possível encontrar outros compostos oxigenados como a 2-undecanona (21), que podem ser encontrados no lúpulo, mas sua contribuição à bebida advém da fermentação.

Desta forma, acredita-se que ao adicionar o OE de lúpulo as cervejas depois da fermentação, a grande disponibilidade dos terpenos principais (mirceno, humuleno e cariofileno) em solução resultaram em grandes quantidades de compostos oxigenados através da oxidação, gerando ésteres que reagiriam com estes compostos da fermentação. Compostos oxigenados são mais solúveis em água que terpenos, assim, tendem a ficarem mais retidos na cerveja, resistindo ao arraste por CO₂ gerado na fermentação, como mencionado previamente. Isso busca explicar porque compostos como linalol e 2-undecanona estão mais intensos em amostras com OE. Em resumo, a alta disponibilidade de terpenos gera compostos oxigenados em abundância, por sua vez, mais resistentes à volatilização devido a solubilidade em água.

Ésteres do lúpulo se destacaram para as amostras com OE, isso se deve ao fato do equilíbrio entre ésteres em solução. A alta disponibilidade de linalol possibilita oxidações a geraniol, precursor dos ésteres de geranila provenientes do lúpulo. Deve-se considerar também que a maturação da bebida com OE ocorreu pelo mesmo tempo que o processo de DH, o que possibilitou tempo o suficiente para estas reações acontecerem.

Tais explicações adequam-se com o fato de que compostos não identificados nas amostras de DH mas identificados nas amostras com OE pertencem a classe de compostos oxigenados: ésteres da fermentação e do lúpulo, bem como álcoois e cetonas. A ausência desses compostos na identificação pode estar atrelada às justificativas abordadas.

Problemas envolvendo oxidação do mirceno, deslocamento de equilíbrio entre ésteres e perda de voláteis por inatividade enzimática dificultam a previsão do produto final com as

características desejadas e, neste caso, poderia talvez ser resolvido caso a adição ocorresse antes do envase, pois durante a estocagem o produto é selado, dificultando ou impossibilitando o acesso a oxigênio externo, evitando processos oxidativos e arraste por CO₂.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, a composição volátil de amostras de cervejas artesanais do estilo APA foi investigada para lupulagens adicionais na forma de *dry hopping* e por adição de óleo essencial, buscando avaliar se a adição direta de óleo essencial aumentaria a quantidade de compostos de aroma de lúpulo nessa amostra. Utilizando-se de técnicas de SPME e GC-MS foram realizadas a extração, separação e identificação dos compostos voláteis presentes nas cervejas. Assim, com o auxílio de análises quimiométricas, foi possível agrupar as amostras em acordo com a lupulagem utilizada, por meio da PCA, e destacar compostos importantes para cada adição de lúpulo. Desta forma, verificou-se compostos da fermentação, maturação e lupulagem importantes para o perfil aromático da bebida, e foi possível levantar hipóteses relacionadas à algumas de suas interações e transformações intermoleculares, considerando reações de oxidação, esterificação, hidrólises de ésteres e equilíbrio químico.

A partir da análise percebeu-se resultados destoantes com o esperado, entretanto utilizou-se de explicações sobre a extração desfavorecida de terpenos em baixas temperaturas e a degradação de terpenóides pelo contato com o ar para justificar a alta presença de hidrocarbonetos terpênicos e baixa concentração de terpenóides nas amostras que passaram por DH. Para amostras com OE, utilizou-se de explicações sobre oxidação de terpenos, equilíbrio entre ésteres e alta solubilidade de compostos oxigenados para justificar a alta presença de terpenóides oxigenados.

A adição de OE em substituição ao processo de DH ainda merece estudos mais detalhados, com mais amostras e variedades de lúpulos, ponderando desde o início da preparação das amostras a influência de reações paralelas, destacando-se a importância de considerar as influências mensuradas aqui para uma boa aplicação da técnica, atentando-se não só a natureza das matérias-primas, mas também em relação à utilização destas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDAMS, R. P. **IDENTIFICATION OF ESSENTIAL OIL COMPONENTS BY GAS CHROMATOGRAPHY/ MASS SPECTROMETRY**. ed 4.1; 2017.
- 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.
- BORTOLI, Daiane A. da S.; SANTOS, Flávio dos; STOCCO, Nádia M.; ORELLI Jr., Alessandro; TOM, Ariel; NEME, Fernanda F.; NASCIMENTO, Daniela Defavari do; **Leveduras e produção de cervejas - Revisão**. Bioenergia em revista: diálogos, ano 3, n. 1, p. 45-58, jan./jun. 2013.
- BREWHOUSE. **Brewhouse, insumos cervejeiros**. 2022. Disponível em: <https://www.brewhouseinsumos.com.br/lupulo-columbus>. Acesso em: 20/8/2022.
- BRO, R., SMILDE, A. K., **Principal component analysis**. The Royal Society of Chemistry. Anal. Methods, v. 6, p. 2812–2831, 2014.
- CALDAS, S. S. et al. **Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas**. Química Nova, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.
- CHEMOFACE. Cleiton A. Nunes; Universidade Federal de Lavras. 2020. Disponível em: <https://www.ufla.br/chemoface>.
- DE KEUKELEIRE, D. **Fundamentals of beer and hop chemistry**. Química Nova, n. 23, p. 108-112. 2000.
- DIETZ, C.; COOK, D.; HUISMANN, M.; WILSON, C.; FORD, R.; **The multisensory perception of hop essential oil: a review**. Journal of the Institute of Brewing. 2020.
- DIETZ, C.; COOK, D.; HUISMANN, M.; WILSON, C.; OLIVEIRA, P.; FORD, R.; **Exploring the multisensory perception of terpene alcohol and sesquiterpene rich hop extracts in lager style beer**. Food Research International 148. 2021.
- Kaltner, D., & Mitter, W.; **Possible impact of hops on taste and drinkability of beer**. Germany: Fachverlag Hans Carl: Nürnberg. 2006.
- 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.
- DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; JUNIOR, S. B.; **Química do Lúpulo**. Quim. Nova, Vol. 42, No. 8, p. 900-919. 2019
- FELIPE, L. O.; BICAS, J. L.; **Terpenos, Aromas e a Química dos Compostos Naturais**. Quim. Nova, Vol. 39, No. 2, p. 120-130. 2017
- FOSTER, A.; GAHR, A.; **On the Fate of Certain Hop Substances during Dry Hopping**. Brewing Science, vol. 66, p. 93-103. 2013.
- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**, Editora LTC, 8ª edição, 2012.
- HUI, Y. H.; associate editors. **Handbook of food products manufacturing**. John Wiley & Sons, Inc. 2007
- 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.

Ksenija Rutnik, Maša Knez Hrnčič & Iztok Jože Košir, Hop Essential Oil: Chemical Composition, Extraction, Analysis, and Applications, Food Reviews International, 2021.
MATLAB. The language of technical computing. The MathWorks, Inc, 2017. Disponível em:

<http://www.mathworks.com>.

MEGA, J. F.; NEVES, E.; DE ANDRADE, C.J.; **A PRODUÇÃO DA CERVEJA NO BRASIL**. Revista CITINO. v. 1, n. 1, p. 34–42. 2011.

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

NELSON, M. **THE BARBARIAN'S BEVERAGE. A History of Beer in Ancient Europe**. 2005.

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.

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.

POELMANS, E.; SWINNEN, J. F. M.; **A Brief Economic History of Beer**. 2012

RETTBERG, N.; BIENDL, M.; GARBE, L.; **Hop Aroma and Hopy 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.

SHARPE, F. R.; LAWS, D. R. J.; **THE ESSENTIAL OIL HOPS. A REVIEW**. J. Inst. Brew. v. 87, p. 96-107. 1981.

SILVEIRA, J. C.; BUSATO, N. V.; COSTA, A. O. S.; JUNIOR, E. F. C.; **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v.8, n.15; p. 2042-2043. 2012

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

TAN, Y.; SIEBERT, K. J.; **Quantitative Structure–Activity Relationship Modeling of Alcohol, Ester, Aldehyde, and Ketone Flavor Thresholds in Beer from Molecular Features**. J. Agric. Food Chem. v. 52, n. 10, p. 3057–3064. 2004

TOFFOLI, A. L., LANÇAS, F. M. **Recentes avanços da microextração em fase sólida no tubo (in-tube SPME) e sua aplicação em análises ambientais e alimentícias**. Scientia Chromatographica. . 7(4):297-315. 2015

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

XU, Y.; MINHAZUL, K. A. H. M.; LI, X.; **The occurrence, enzymatic production, and application of ethyl butanoate, an important flavor constituent**. Flavour Fragr J. ;35: P. 601–615. 2020