



RODRIGO MANCINI SANTOS

**INVESTIGAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DA
INFLUÊNCIA DA PASTEURIZAÇÃO NA
FRAÇÃO VOLÁTIL DE CERVEJAS
ARTESANAIS**

LAVRAS – MG

2022

RODRIGO MANCINI SANTOS

**INVESTIGAÇÃO QUIMIOMÉTRICA DA INFLUÊNCIA DA
PASTEURIZAÇÃO NA FRAÇÃO VOLÁTIL DE CERVEJAS
ARTESANAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal de Lavras, como parte das
exigências do curso de Química (Bacharelado),
para obtenção do título de Bacharelado.

Márcio Pozzobon Pedroso
Orientador

LAVRAS – MG

2022

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha família, por todo o carinho e apoio durante minha vida. Ao meu pai e minha mãe, agradecer pelo fato de sempre priorizarem a minha educação acima de qualquer outra coisa, por me incentivar a estudar o que gosto e alcançar meus sonhos.

Gostaria de agradecer também os amigos que fiz durante a graduação. Agradecer o apoio mútuo, o carinho, a parceria, as risadas e os desabafos. Foi um privilégio estudar e conviver com uma turma tão engajada, divertida e unida.

Agradeço também ao professor Marcio Pozzobon Pedroso, por me orientar por mais de um ano na iniciação científica e, por fim, no meu trabalho de conclusão de curso. Foi um período de grande aprendizado e construção.

Por fim, agradeço também as técnicas Mariana e Maria Aparecida, carinhosamente chamada de Xulita, por todos os ensinamentos, conselhos e ajuda durante o desenvolvimento do meu estágio.

RESUMO

Neste trabalho estudou-se os efeitos da pasteurização na fração volátil de cervejas artesanais, sendo necessário a utilização de ferramentas quimiométricas para esta investigação. Para que o estudo fosse possível, foram utilizadas 12 amostras de cerveja, constituídas por pares não pasteurizados e pasteurizados de diferentes estilos. As amostras foram submetidas à microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME), e posteriormente analisadas em triplicata em um cromatografo a gás acoplado a um espectrometro de massas (GC-MS). Tendo em vista que a utilização de diferentes estilos de cerveja dificultam a avaliação dos efeitos da pasteurização, foi primeiramente necessário filtrar as variáveis, utilizando a análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) e calculando a importância das variáveis na projeção (VIP). Com as variáveis filtradas, foi possível realizar novamente uma PLS-DA com fins exploratórios. Ao todo, 22 compostos foram identificados como importantes na explicação dos efeitos da pasteurização em cervejas artesanais, mostrando que há uma diferença na composição volátil de cervejas não pasteurizadas e pasteurizadas. Foi observado uma tendência entre os ésteres, sendo que os ésteres mais ramificados se encontravam mais presentes em amostras não pasteurizadas, e ésteres menos ramificados se encontravam mais presentes em amostras pasteurizadas. Isso indicou que a pasteurização pode estar favorecendo ou acelerando reações que alterem a composição volátil. Além disso, foi observado que alguns constituintes do óleo essencial do lúpulo também variavam, indicando novamente que a pasteurização pode estar favorecendo ou acelerando reações no meio químico das cervejas. Entretanto, foi difícil afirmar com precisão quais reações foram favorecidas ou aceleradas pelo processo de pasteurização.

Palavras-chave: Pasteurização, quimiometria, microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), ésteres, constituintes do óleo essencial do lúpulo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 – 1) Reservatório de gás e controle de vazão/pressão. 2) Injetor (Vaporizador) de amostra. 3) Coluna cromatográfica e forno da coluna. 4) Detector. 5) Eletrônica de tratamento (Amplificação) de sinal. 6) Registrador de sinal.	15
Figura 3.2 – O esquema representa a microextração em fase sólida pelo <i>headspace</i> (HS-SPME).	18
Figura 3.3 – A imagem apresenta dois cromatogramas, de duas amostras de cerveja extraídas por meio da técnica HS-SPME	20
Figura 5.1 – Cromatograma ilustrativo da primeira replicata da amostra de IPA não pasteurizada, visualizado por meio do software AMDIS.	31
Figura 5.2 – a) Cromatogramas das replicatas das amostras de IPA não pasteurizada e pasteurizada. b) Cromatogramas das replicatas das amostras de Pilsen não pasteurizada e pasteurizada.	32
Figura 5.3 – a) Cromatogramas de íons totais de todas as amostras e suas respectivas replicatas sobrepostos, sem pré-processamento ou alinhamento. b) Após alinhamento utilizando o algoritmo COW.	34
Figura 5.4 – a) Cromatogramas sobrepostos e alinhados sem correção de linha base. b) Cromatogramas sobrepostos e alinhados com correção de linha base.	35
Figura 5.5 – Gráfico de barras mostrando a variância explicada por cada componente principal.	36
Figura 5.6 – Gráfico de <i>scores</i> da PCA construído com os dados de TIC das amostras pasteurizadas e não pasteurizadas.	37
Figura 5.7 – Gráfico de <i>scores</i> da PLS-DA construído a partir dos valores de TIC das amostras pasteurizadas (P) e não pasteurizadas (NP).	38

Figura 5.8 – Gráfico de <i>VIP scores</i> calculados para cada variável, dispostos graficamente contra o tempo de retenção, em que a parte em vermelho tem-se $VIP_j > 1$, as quais foram numeradas em ordem crescente e aceitas como relevantes	40
Figura 5.9 – Gráfico de <i>scores</i> do modelo PLS-DA exploratório construído a partir dos dados de área, em que os compostos avaliados são apenas os apontados como importantes pelo cálculo de <i>VIP scores</i>	43
Figura 5.10 – (a) Rotação do modelo tridimensional para observar LV1 vs LV2 (b) Rotação do modelo tridimensional para observar LV2 vs LV4.	44
Figura 5.11 – Projeções bidimensionais do modelo PLS-DA, em que estão dispostos os gráficos de <i>scores</i> e de <i>loadings</i> da LV1 vs LV2 e LV2 vs LV4.	44
Figura 5.12 – (a), (b) e (c) são ésteres de cadeia mais ramificada, mais presentes em não pasteurizadas. (d), (e), (f) e (g) são ésteres com cadeia menos ramificada, mais presentes em pasteurizadas. . .	45
Figura 5.13 – (a) Mirceno (6), (b) Linalol (12) (c) Geranato de Metila (20), (d) Geraniol (18). São constituintes do óleo essencial do lípulo observados pela LV1.	45
Figura 5.14 – (a) Isopentanoato de 2-metilbutila (13), (b) Propanoato de 2-metilbutila (5) (c) Heptanoato de Etila (11), (d) Citronelol (17). Estes são os compostos mais importantes na LV2	46
Figura 5.15 – Produtos de auto oxidação do Mirceno.	50
Figura 5.16 – Produtos de auto oxidação do Linalol.	51
Figura 5.17 – Possível rota de biossíntese do Geraniol, Geranial, Ácido Gerânico e Geranato de Metila em plantas.	54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 – A tabela mostra os picos explicitados pelo cálculo do VIP como relevantes para agrupamento observado no modelo identificados, juntamente com seu tempo de retenção, índice de retenção experimental e teórico, além da similaridade de espectros de massa experimentais e da biblioteca NIST. 41
- Tabela 5.2 – Resumo da variação dos compostos. NP indica Não Pasteurizado e P Pasteurizado. O "X" assinalado indica em qual classe o composto se encontra mais presente. 47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVO	11
2.1	Objetivo geral	11
2.2	Objetivos específicos	11
3	REFERENCIAL TEÓRICO	12
3.1	Histórico da cerveja	12
3.2	Pasteurização	13
3.3	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)	14
3.4	Micro extração em fase sólida (SPME)	18
3.5	Quimiometria	20
3.5.1	Tratamento de dados	21
3.5.2	PLS-DA	22
3.5.3	Otimização do modelo	23
3.5.4	Validação do modelo	24
3.5.5	Interpretação do modelo	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	Amostras e preparo de amostras	26
4.2	HS-SPME GC-MS	26
4.3	Análise quimiométrica	28
4.3.1	Softwares	28
4.3.2	Tratamento dos dados	28
4.3.3	Modelo PCA e de classificação	29
4.3.4	Otimização do modelo	29
4.3.5	Validação do modelo	30
4.3.6	Interpretação do modelo	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	31

5.1	Alinhamento	33
5.2	Utilização da PCA para exploração dos dados	35
5.3	Selecionando variáveis com a PLS-DA	38
5.4	Construção e interpretação do modelo exploratório PLS-DA com dados de área	42
5.4.1	Entendendo os Ésteres	48
5.4.2	Entendendo os Terpenos	50
6	CONCLUSÃO	55

1 INTRODUÇÃO

Traços semelhantes do que hoje é chamado de cerveja foram encontrados remetendo a milhares de anos atrás, em locais muitos diversos e distantes, incluindo o norte do continente africano, China e Europa (POELMANS; SWINNEN, 2011). É incerto onde a técnica de produção de cerveja foi descoberta, seja ela descoberta em um local, se espalhando assim para o resto do mundo, ou então descoberta em diversas localidades, independentemente, ao mesmo tempo (POELMANS; SWINNEN, 2011). Indícios apontam que a cerveja era produzida e consumida há mais de 7.000 anos, na China (POELMANS; SWINNEN, 2011).

A cerveja é tipicamente produzida por grandes corporações, geralmente empresas multinacionais (UNGER, 2004). A imagem da cerveja, ou seja, da bebida atualmente chamada de cerveja, e seus métodos de produção, são frutos do século XIX, sendo a grande transformação da indústria cervejeira resultado da moderna industrialização nos meios de produção, com o uso extensivo de maquinários e diminuição da força humana na produção de cervejas (UNGER, 2004).

Juntamente com a modernização da produção de cervejas, a utilização de métodos científicos como forma de garantir a qualidade biológica de cervejas, e também da reprodutibilidade do seu perfil organoléptico, uma vez que a cerveja é uma bebida para fins recreativos, foi adotada (POELMANS; SWINNEN, 2011), o que proporcionou diversos estudos na área.

Quando se deseja analisar o perfil volátil de cervejas, a cromatografia gasosa se mostra uma boa ferramenta, uma vez que é capaz de separar os diversos compostos responsáveis tanto pelo aroma quanto pelo sabor da cerveja. Um estudo feito por Giannetti et al. (2019) utilizou da cromatografia gasosa e da Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) para caracterizar cervejas artesanais do estilo Pilsen e estudar compostos responsáveis por seu sabor e aroma.

Em outro estudo, desenvolvido por Lund et al. (2012), foi investigado o efeito da pasteurização em cervejas quanto à influência na composição proteica e a estabilidade oxidativa durante o período de envelhecimento. Nesse mesmo artigo, de forma breve, também se estudou o efeito da pasteurização na fração volátil da cerveja, chegando às conclusões a respeito dos efeitos dessa técnica amplamente utilizada na indústria quanto ao sabor e aroma da cerveja. O artigo menciona que a pasteurização, apesar de pouco, influencia no perfil volátil de cervejas.

Devido a falta de trabalhos publicados a respeito dos efeitos da pasteurização no perfil volátil de cervejas, faz-se necessário mais aprofundamento neste tema. Dessa maneira, o trabalho apresentado visa investigar especificamente o efeito da pasteurização em cervejas artesanais quanto ao seu perfil volátil, responsável por grande parte das propriedades organolépticas da cerveja, buscando colaborar e engrandecer para o conhecimento e relevância deste tema na comunidade científica.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Investigar os possíveis efeitos da pasteurização no perfil volátil de cervejas artesanais a partir da utilização de métodos quimiométricos, e com isso buscar explicar a possível origem dos efeitos observados.

2.2 Objetivos específicos

- Empregar a técnica HS-SPME para extração dos compostos voláteis;
- Separar e identificar analitos presentes na amostra a partir da GC-MS;
- Identificar os compostos presentes na composição volátil de cervejas que variam a partir do processo de pasteurização térmica.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Histórico da cerveja

A primeira menção literária sobre cerveja firma sua posição como pertencente a cultura de um povo e sua influência civilizatória (WYNNE, 2019). No poema *Gilgamesh*, o relato mitológico conta que um rei sumério, que reinou há cerca de 4.700 anos atrás, chamado Ekindu, foi levado à uma vila e foi suplicado para que tomasse cerveja, o que era um costume daquele povo. Assim sendo, após beber a cerveja e consumir pão que também lhe fora oferecido, Ekindu foi ao menos considerado pronto para adentrar à sociedade civilizada e prosseguir para a capital de Gilgamesh, Uruk (WYNNE, 2019).

Entre o período de 10.400 e 9.000 anos atrás, no oriente próximo, vilas começaram a se estabelecer, possuindo uma alimentação a base de cereais, sendo cevada e trigo os cereais escolhidos para a domesticação, fazendo dessa região pioneira na produção de cerveja a base de cevada (WYNNE, 2019).

Há cerca de 5.000 anos atrás, a recém civilizada Enkidu foi levada para Uruk, sendo que uma sociedade fortemente estratificada já havia se desenvolvido na Mesopotâmia, em que habilidades especializadas ploriferaram, além de papéis sociais (WYNNE, 2019). Apesar de muitos cidadãos ainda morarem no campo, os mais importantes viviam nas cidades, sendo alguns deles cervejeiros, um papel inicialmente desenvolvido por mulheres (WYNNE, 2019).

Os indicadores mais antigos de produção de cerveja na europa são de 5.000 à 3.000 anos antes de cristo, onde em muitas regiões europeias onde agoram estão associadas ao consumo de vinho, as pessoas bebiam majoritariamente ou unicamente cerveja, em que essa tradição percorreu por milhares de anos (POELMANS; SWINNEN, 2011).

A cerveja atualmente produzida tem pouco em comum com a bebida que possuía o mesmo nome ou nome similar na idade média europeia, no período

renascentista ou no início da história da cerveja, apesar de que é verdadeiro que a cerveja é uma infusão de grãos, fermentados após resfriamento, e de alguma forma clarificada anterior ao seu consumo (UNGER, 2004).

Essa definição de cerveja tem em comum algumas características definidas por Louis Pasteur, um cientista famoso na história e reconhecido como um dos pais da cervejaria moderna, que definiu de forma muito mais rigorosa o que poderia ser chamado de cerveja (UNGER, 2004). A palavra "cerveja" é usualmente utilizada para nomear bebidas não destiladas e fermentadas a base de malte, com relativa baixa graduação alcoólica (UNGER, 2004). Durante a vida de Pasteur, a cerveja se tornou um produto mais padronizado, e como consequência sua replicabilidade se tornou muito mais consistente em toda Europa, e atualmente, em todo o mundo, fato que não se confirmava durante a idade média (UNGER, 2004).

3.2 Pasteurização

O tratamento térmico de alimentos antecede a história datada, sendo que desde a descoberta do fogo, seres humanos o usaram para preparar e preservar alimentos, além de melhorar o seu sabor (STEELE, 2000).

Entretanto, a aplicação de calor à líquidos, como bebidas, é uma prática recentemente datada (STEELE, 2000). Em 1782, o cientista sueco Scheele utilizou calor para preservar vinagre. Já em 1824, William Dewees, um professor de obstetricia da Universidade da Pennsylvania, recomendou aquecer o leite próximo ao ponto de ebulição e depois resfriá-lo para alimentar crianças (STEELE, 2000).

No período de 1860 a 1864, Louis Pasteur resolveu o problema da deterioração do vinho, descobrindo que ao aquecer o vinho à uma temperatura suficiente e por tempo suficiente, os microorganismos de deterioração presente no vinho eram eliminados (STEELE, 2000). Além disso, a técnica ainda seria capaz de preservar as características básicas do produto, assim sendo, futuramente aplicou essa técnica de forma bem sucedida em cervejas (STEELE, 2000).

A produção de cerveja industrial termina com o processo de pasteurização térmica, processo esse que busca garantir a segurança microbiológica da bebida e também aumentar o tempo de prateleira (DENG et al., 2018), elevando esse tempo para diversos meses, algo que pode ser atingido ao inativar microorganismos relacionados à deterioração da cerveja (BUZRUL, 2007). A pasteurização térmica usualmente aplicada em cervejarias é de 15 unidades de pasteurização (PU), o que equivale à um aquecimento de 60°C por 15 minutos (DENG et al., 2018).

Apesar das vantagens citadas, a pasteurização da cerveja pode ocasionar a perda de nutrientes e compostos relacionados ao sabor e aroma das cervejas (DENG et al., 2018). Assim sendo, apesar de a temperatura aplicada durante o processo de pasteurização térmica ser baixa, é desejado que essa temperatura seja a menor possível, para evitar a perda de propriedades organolépticas importantes da cerveja (BUZRUL, 2007). Dessa maneira, muitas pesquisas tem se voltado a desenvolver métodos de pasteurização não térmicos, a fim de contornar o problema do consumidor e manter a produção de cerveja em escala industrial (DENG et al., 2018). Embora o processo de pasteurização seja simples, para analisar seus efeitos na cerveja é necessário o uso de técnicas sofisticadas, as quais são capazes de verificar pequenas variações.

3.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

A cromatografia gasosa (CG) é uma técnica de separação e análise de compostos voláteis, onde a amostra é vaporizada e introduzida à um fluxo de gás, denominado fase móvel (FM), passando por um tubo, chamado coluna cromatográfica, contendo a fase estacionária (FE), em que a partir da interação dos compostos com a FE por adsorção ou absorção, eles são separados (POOLE, 2021).

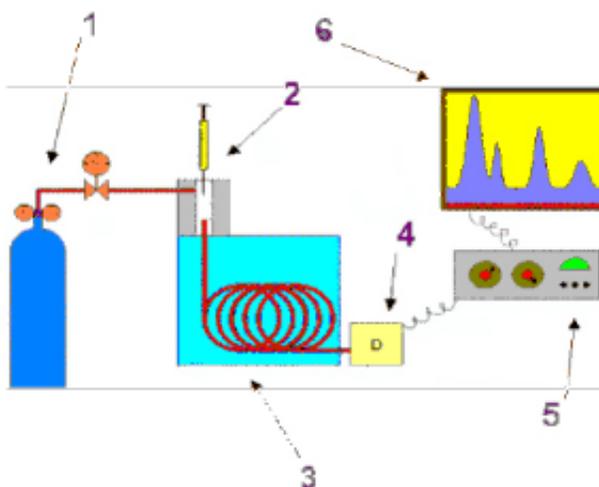
Assim sendo, os aspectos que governam na separação dos compostos de uma amostra são: a solubilidade na FE, em que quanto mais solúvel, mais retido um composto ficará na coluna cromatográfica, e a volatilidade desse composto, em

que quanto maior sua volatilidade, menor sua retenção na coluna cromatográfica (POOLE, 2021).

A coluna cromatográfica é submetida à uma temperatura ou variação de temperatura, a qual será responsável por controlar a interação dos compostos com a FE baseado na sua volatilidade, sendo que quanto maior a temperatura, maior será a concentração de voláteis na FM. Assim sendo, a separação dos compostos de uma matriz complexa é atingida a partir da escolha da FE, que pode ser mais apolar ou mais polar, e do controle da temperatura na coluna cromatográfica (POOLE, 2021).

Os compostos separados saíram da coluna cromatográfica em direção à um detector, como mostra a Figura 3.1, onde serão colhidas informações importantes a respeito desses compostos, como tempo de retenção e área de pico na amostra (POOLE, 2021). Além disso, com um detector espectrométrico é possível obter informações a respeito da estrutura dos compostos eluídos, o que permite sua posterior identificação (POOLE, 2021).

Figura 3.1 – 1) Reservatório de gás e controle de vazão/pressão. 2) Injetor (Vaporizador) de amostra. 3) Coluna cromatográfica e forno da coluna. 4) Detector. 5) Eletrônica de tratamento (Amplificação) de sinal. 6) Registrador de sinal.



Fonte: Augusto (2000)

As informações obtidas na análise são dispostas em um cromatograma, onde no eixo x se localiza o tempo de retenção, e no eixo y, a medida da quantidade do composto. A informação contida no eixo y é apresentada a partir de picos, com formato que lembram uma curva gaussiana (POOLE, 2021).

O detector é um dispositivo que indica e quantifica componentes separados pela coluna cromatográfica, em que um grande número de diferentes detectores vem sendo utilizados em CG (POOLE, 2021). A fase de trabalho gasosa, as concentrações baixas e seu alcance, aspectos comuns entre a CG e a espectrometria de massas (MS), fazem do MS um detector quase perfeito para a CG (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010).

Como qualquer outro detector cromatográfico, a MS consiste em dar respostas a respeito dos componentes que eluem da coluna cromatográfica, neste caso, a medição obtida nos cromatogramas é a Corrente Iônica Total, a qual é processada em função do tempo (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010).

Dessa maneira, a partir do cromatograma da Corrente Iônica Total, é possível obter a área dos picos cromatográficos, importante medida para quantificar analitos a partir de uma curva de calibração (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2010). Além disso, como a MS é uma técnica de elucidación estrutural de compostos, é possível também ao utilizar este detector identificar compostos importantes presentes na amostra (POOLE, 2021).

O tempo de retenção obtido para cada composto durante a análise é uma característica específica do analito, da fase estacionária e das condições de análise, assim sendo, essa propriedade da amostra pode ser utilizada para identificação, isso baseando-se na comparação entre análise de compostos desconhecidos e análise de compostos conhecidos, sob as mesmas condições experimentais e instrumentais (MCNAIR; MILLER; SNOW, 2019). Assim sendo, com um experimento bem delineado, a utilização do índice de retenção, que é calculado a partir do

tempo de retenção, como forma de identificação de compostos é bem reproduzível (MCNAIR; MILLER; SNOW, 2019).

Uma utilização importante do espectrômetro de massas como detector do cromatógrafo a gás é para a identificação de compostos, uma vez que compostos com diferentes combinações de átomos com m/z similares terão diferentes sinais no espectro de massas, o que fornece uma ferramenta poderosa para sua identificação (POOLE, 2021).

Com a evolução de métodos computacionais e sofisticação das técnicas cromatográficas e espectrométricas, o uso de bibliotecas passou a ser uma inestimável ferramenta para a rápida identificação de compostos e fornece informações valiosas a respeito de compostos desconhecidos na amostra (POOLE, 2021). Várias bibliotecas estão disponíveis comercialmente, contendo dezenas de milhares de espectros para comparação, entre as maiores e mais populares, a biblioteca NIST-17, contendo mais de 300.000 espectros (POOLE, 2021).

Entretanto, apenas a comparação de espectros não fornece uma confiança perfeita a respeito da identidade do composto, fazendo necessário a análise de outras propriedades ou então o uso de técnicas complementares (MCNAIR; MILLER; SNOW, 2019). Uma técnica complementar possível de ser utilizada para a identificação de compostos é o cálculo do índice de retenção (MCNAIR; MILLER; SNOW, 2019).

O primeiro sistema de índice de retenção (RI) foi proposto por Kovats, em 1958 (CAZES, 2001), para condições isotérmicas da análise por cromatografia gasosa. Para este cálculo é utilizado uma série de n-alcenos $n - C_nH_{2n+2}$, com índices de retenção postulado como sendo $100n_c$, nomeados como padrões, sendo estes compostos de referência (CAZES, 2001).

Assim sendo, a partir da Equação 3.1, é possível calcular o índice de retenção de Kovats, onde $t'_{R,x}$ é o tempo de retenção do analito, $t'_{R,k}$ e $t'_{R,k+1}$ são os

tempos de retenção do primeiro alcano menos retido que o analito e o primeiro alcano mais retido que o analito (CAZES, 2001).

$$RI_x = 100 \left(k + \frac{\log(t'_{R,x}/t'_{R,k})}{\log(t'_{R,k+1}/t'_{R,k})} \right) \quad (3.1)$$

Sendo k o número de átomos de carbono dos n-alcenos que eluem antes do analito em questão. A proposta de Kovats se tornou muito popular na cromatografia gasosa, tendo sido citada por diversos trabalhos na área (CAZES, 2001).

3.4 Micro extração em fase sólida (SPME)

Para que a separação feita pelo GC-MS seja ideal, é necessário realizar o preparo correto da amostra. Dessa maneira, para se analisar a fração volátil de bebidas como a cerveja, a SPME se apresenta como bastante promissora. A Figura 3.2 mostra o esquema de uma extração feita por HS-SPME.

Figura 3.2 – O esquema representa a microextração em fase sólida pelo *headspace* (HS-SPME).



Fonte: Lancioni et al. (2022)

A SPME foi proposta no ano de 1989 por Arthur e Pawliszyn, sendo esta uma técnica de extração que envolve uma fibra de sílica fundida com um filme polimérico, a qual pode ser imersa na amostra ou então colocada no *headspace*,

como mostrado na Figura 3.2, que seria o não contato da fibra com a solução, extraindo apenas os voláteis (CALDAS et al., 2011).

Dessa forma, após extração do analito pela fibra, os analitos são des-sorvidos no injetor do cromatógrafo à gás, sendo o procedimento mais comum a dessorção térmica, a qual elimina a necessidade de utilizar solventes orgânicos (CALDAS et al., 2011).

A SPME é um processo baseado em equilíbrios simultâneos de sistemas multifásicos, podendo este método de extração ser modelado a partir de um sistema ideal trifásico, constituído da amostra, o *headspace* e a fase extratora (VALENTE; AUGUSTO, 2000). Entretanto, em sistemas reais é adicionado uma certa complexidade, uma vez que nenhuma das fases envolvidas são soluções ideais (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

A partir de um modelo que considere um sistema ideal trifásico é possível entender a distribuição de massas durante a extração por SPME. Anterior à extração, n_0 mols do analito estariam presentes na amostra, com uma concentração C_0 e um volume V_m . Quando completa a extração, esses n_0 mols do analito estão distribuídos em três fases, como mostra a Equação 3.2, em que n_m^e está na matriz aquosa, n_h^e no *headspace* e n_f^e na fibra, onde o sobrescrito e representa equilíbrio (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

$$n_0 = n_m^e + n_h^e + n_f^e \quad (3.2)$$

Dessa maneira, a SPME se baseia no equilíbrio de partição, e pode ser descrito termodinamicamente pela Equação 3.3, a qual relaciona a quantidade extraída do analito com os parâmetros fundamentais dos equilíbrios simultâneos, as constantes de distribuição entre fases, assim como os respectivos volumes (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

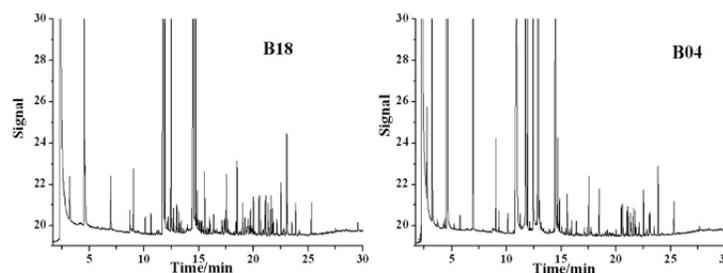
$$n_f^e = \frac{K_{fm}V_fC_0V_m}{K_{fm}V_f + K_{hm}V_h + V_m} \quad (3.3)$$

Entretanto, a Equação 3.3 não fornece informações a respeito do tempo necessário para atingir o equilíbrio, parâmetro fundamental a se considerar experimentalmente, assim sendo, a partir da Equação 3.4, é possível obter essa estimativa (VALENTE; AUGUSTO, 2000).

$$t_e \approx t_{95} = \frac{L_f^2}{2D_f} \quad (3.4)$$

Considerando a espessura do recobrimento L_f e o coeficiente de difusão do soluto nessa camada D_f , observa-se que o tempo para atingir o equilíbrio seria infinito, entretanto, para fins práticos, assume-se como equilíbrio quando 95% do analito foi extraído, o que levaria um tempo finito (t_{95}) (VALENTE; AUGUSTO, 2000). A Figura 3.3 mostra dois exemplos de cromatogramas de amostras de cerveja extraídos por meio da técnica HS-SPME.

Figura 3.3 – A imagem apresenta dois cromatogramas, de duas amostras de cerveja extraídas por meio da técnica HS-SPME



Fonte: Silva, Augusto e Poppi (2008)

Vale ressaltar que os cromatogramas apresentados na Figura 3.3 foram obtidos utilizando o Detector de Ionização por Chama (FID).

3.5 Quimiometria

Análises quimiométricas são um conjunto de ferramentas estatísticas e que possuem um importante papel na compreensão e interpretação de dados provenientes de análises químicas instrumentais, como a cromatografia gasosa. Essas

ferramentas permitem que grandes volumes de dados sejam trabalhados em processos os quais não seriam possíveis em análises manuais ou tradicionais (POOLE, 2021).

Dessa forma, a quimiometria preenche uma série de papéis analíticos, como a identificação e quantificação de analitos, reconhecimento de padrões e classificação. Vale ressaltar que a aplicação de modelos quimiométricos pode ser realizada tanto em dados aproximadamente contínuos ou então em dados escalares, contudo, a forma que os dados serão processados depende de sua natureza.

3.5.1 Tratamento de dados

Dado a complexidade dos dados provenientes da análise por cromatografia gasosa, faz-se necessário a aplicação de pré tratamentos, uma vez que informações importantes usualmente estão escondidas entre variações químicas irrelevantes, as quais precisam ser corrigidas (POOLE, 2021). Um exemplo é a correção de linha de base, a qual possibilita a correção de desvios na linha de base dos cromatogramas, que em muitas vezes acabam dando mais relevância ao ruído presente durante as análises quimiométricas, podendo ser causadas por sangramento da coluna, ionização de fundo e variações do detector (POOLE, 2021).

O airPLS é um algoritmo de correção de linha de base e baseia-se no algoritmo de Quadrados Mínimos Penalizados (PLS) proposto por Whittaker (1922), o qual através da deformação de sinais (ou picos) buscava melhorar a resolução de compostos com baixa concentração. Com o algoritmo de mínimos quadrados penalizados, outro efetivo algoritmo baseado em quadrados mínimos assimétricos foi proposto por Eilers, Boelens e Hankemeier (1922), o qual fornece assimetria para os mínimos quadrados calculados. Portanto, dois parâmetros chamados assimetria (p) e achatamento (λ) podem ser otimizados a fim de se obter uma boa correção de linha de base. Entretanto, o algoritmo proposto considera a assimetria igual para todos os pontos da linha de base, assim sendo, o algoritmo airPLS, publicado por

Zhang, Chen e Liang (2010), entende que deveriam haver pesos diferentes para os diferentes pontos da linha de base, assim sendo, para cromatogramas, onde é importante preservar a área de picos para observar sua variação, o airPLS pode ser vantajoso.

Após a correção de linha de base dos cromatogramas, nota-se a necessidade de alinhá-los, uma vez que a variação no tempo de retenção entre cromatogramas esconde importantes variações químicas, informações as quais se deseja obter durante a análise dos dados (POOLE, 2021). Dessa forma, um algoritmo que pode ser utilizado para executar essa tarefa é o Correlation Optimized Warping (COW). O COW divide o cromatograma em diversos segmentos, os quais serão comprimidos e esticados de forma a maximizar o Coeficiente de Correlação de Pearson (PCC) entre os cromatogramas das amostras e o cromatograma de referência (BOS et al., 2020). O PCC pode ser calculado através da Equação 3.5.

$$PCC = \frac{(\mathbf{r} - \bar{r})^T (\mathbf{x} - \bar{x})}{\sqrt{(\mathbf{r} - \bar{r})^T (\mathbf{r} - \bar{r}) (\mathbf{x} - \bar{x})^T (\mathbf{x} - \bar{x})}} \quad (3.5)$$

Em que \mathbf{r} é um vetor que descreve o cromatograma de referência e \mathbf{x} o cromatograma de teste. Dessa maneira, o COW utiliza de dois parâmetros para o alinhamento dos cromatogramas, sendo estes o tamanho do segmento (*Seg*) e o tamanho da deformação (*Slack*) (BOS et al., 2020), assim sendo, os parâmetros são definidos e otimizados experimentalmente para cada caso.

3.5.2 PLS-DA

O reconhecimento de padrões é uma importante ferramenta de análise de dados em cromatografia, uma vez que permite a avaliação de variações reproduzíveis entre amostras a partir de um contexto químico (POOLE, 2021). Métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões podem ser categorizados como supervisionados ou não supervisionados. Métodos não supervisionados são úteis quando se deseja assinalar classes às amostras, já métodos supervisionados são in-

interessantes para descobrir compostos químicos que distinguem as classes de amostras (POOLE, 2021).

Os Mínimos Quadrados Parciais (PLS) foi uma técnica a princípio desenvolvida para resolver problemas de regressão, entretanto, sua extensão para problemas de classificação foi uma importante conquista na quimiometria (BRERETON; LLOYD, 2018). A Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) é um método de reconhecimento de padrões supervisionado, em que as variáveis latentes são definidas por sinais que variam e se correlacionam (POOLE, 2021).

A ideia em torno do PLS-DA consiste em assinalar amostras como valores discretos. As amostras então são postas entre duas classes, usualmente denotadas como +1 ou -1, podendo variar com respeito a vontade do analista, porém sistemas com ± 1 simplificam a matemática envolvida. O bloco \mathbf{X} consiste em uma série de variáveis, contidas em cada amostra, assim sendo, é feito uma regressão do bloco \mathbf{X} com o bloco \mathbf{y} , o qual possui os marcadores de cada classe. Os valores numéricos de $\hat{\mathbf{y}}$ são estimados e utilizados para treinar o modelo, testar o modelo ou externamente assinalar classes (BRERETON; LLOYD, 2018).

3.5.3 Otimização do modelo

A Leave One Out Cross-Validation (LOOCV) é um caso especial da k-fold Cross-Validation, uma vez que na LOOCV, o número de parcelas separadas para validação cruzada é igual ao número de observações do conjunto de dados (WONG, 2015). Esse método é muito utilizado quando o número de observações é pequeno (WONG, 2015), uma vez que seu custo computacional é alto e consegue fornecer um resultado menos enviesado, pois enquanto na k-fold Cross-validation apenas um subconjunto das amostras é utilizada para treino, na LOOCV, todas as amostras são utilizadas para treino e para teste (MAGNUSSON et al., 2019).

A LOOCV então é um método para verificar a confiabilidade do modelo de classificação e otimizá-lo para o número adequado de variáveis latentes (MAGNUSSON et al., 2019), e para isso, utiliza-se de parcelas independentes do conjunto de dados (WONG, 2015), hora tirando uma observação para teste e deixando o resto para treino, hora tirando outra para teste, e assim segue até que todas as amostras sejam testadas individualmente. Dessa forma, o número de previsões corretas em n observações segue uma distribuição binomial com parâmetros n e p , em que sendo x_i a variável aleatória correspondente a previsão da i -ésima observação tem-se $P\{x_i = 1\} = p$ e $P\{x_i = 0\} = 1 - p$ (WONG, 2015). Dessa maneira, a LOOCV é feita com modelos construídos com diferentes números de variáveis latentes, em que aquele que obtiver maior precisão ou menor erro é escolhido como sendo o modelo ótimo.

3.5.4 Validação do modelo

O modal Bootstrap se mostra como uma boa ferramenta para validar modelos de classificação, dado a sua natureza não enviesada. O Bootstrap envolve amostrar \mathbf{X}_i conjunto de dados, cada um contendo n observações as quais serão randomicamente selecionadas para substituir o conjunto de dados originais, o qual a priori possui uma distribuição desconhecida. Essas \mathbf{X}_i observações são denominadas Conjuntos de Bootstrap, e seguirão uma distribuição conhecida, que será aproximadamente a distribuição de Poisson. Assim sendo, são ajustados à um modelo os conjuntos de bootstrap, sequencialmente e independentemente, para obtenção do parâmetro de interesse $\hat{\theta}^*$, no caso, o parâmetro de interesse é a precisão do modelo ao classificar as amostras de cerveja não pasteurizada e pasteurizada. Contudo, $\hat{\theta}^*$ e o desvio padrão correspondente, $\hat{\sigma}_b$, são calculados a partir das Equações 3.6 e 3.7, respectivamente, em que B representa o número de conjuntos de bootstrap (AFANADOR; TRAN; BUYDENS, 2013).

$$\hat{\theta}^{*j} = \frac{\sum \hat{\theta}^{*jb}}{B} \quad (3.6)$$

$$\hat{\sigma}_b = \left[\sum_{b=1}^B \frac{(\hat{\theta}^{*jb} - \hat{\theta}^{*j})^2}{(B-1)} \right]^{1/2} \quad (3.7)$$

Em que $\hat{\theta}^{*j} = VIP_j$, $\hat{\sigma}_b = \hat{\sigma}_{VIP_j}$ e j a j -ésima variável preditora, assim sendo, um intervalo de confiança de 95% é obtido ao realizar um teste t em que assume uma distribuição t (AFANADOR; TRAN; BUYDENS, 2013).

3.5.5 Interpretação do modelo

O modelo pode ser interpretado a partir de seus *loadings*, entretanto, dado a sua complexidade e o número de variáveis latentes necessárias para uma separação ótima, é necessário a utilização de outros recursos aliado aos *loadings*. Dessa maneira, pode ser utilizado a Importância da Variável na Projeção (VIP).

O VIP resume a importância das variáveis originais na projeção para encontrar as variáveis latentes, o que permite uma interpretação química dos resultados obtidos (CHONG; JUN, 2005). Entretanto, não fornece informações a respeito de variáveis mais relevantes por classe como os *loadings* do modelo. Assim sendo, o VIP da j -ésima variável pode ser calculada pela Equação 3.8.

$$VIP_j = \sqrt{p \sum_{k=1}^h (SS(b_k \mathbf{t}_k) (\mathbf{w}_{jk} / \|\mathbf{w}_k\|)^2) / \sum_{k=1}^h SS(b_k \mathbf{t}_k)} \quad (3.8)$$

Contudo, como a média do quadrado dos VIP scores é igual a 1, esse valor é utilizado para denotar quais variáveis são importantes e quais não (CHONG; JUN, 2005). Portanto, para um $VIP_j > 1$ assume-se como sendo uma variável importante.

4 METODOLOGIA

4.1 Amostras e preparo de amostras

Foram utilizadas 12 amostras de cerveja, sendo elas 6 amostras não pasteurizadas e 6 amostras pasteurizadas. As amostras eram de estilos diferentes de cerveja, em que cada estilo possuía uma amostra não pasteurizada e uma pasteurizada. Assim sendo, foram analisados os estilos Pilsen, Summer Ale, Amber, Session, American Pale Ale e Indian Pale Ale. As amostras foram analisadas em triplicata, resultando ao total 36 observações.

Todas as amostras foram obtidas em cervejarias artesanais do município de Lavras-MG, sendo as amostras de Pilsen e Summer Ale provenientes da Cervejaria do Funil e as amostras de Amber, Session, American Pale Ale e Indian Pale Ale da cervejaria Joia Mesquita.

Para a análise, foram transferidos 5 mL de cada frasco de cerveja para um frasco específico de extração e adicionado à essa quantidade 1,3 g de NaCl, a fim de saturar a solução e aumentar a concentração de voláteis no *headspace*. Após isso, agitou-se manualmente a solução para homogeneizá-la. As soluções foram preparadas cerca de 15 minutos antes da extração, com o intuito de evitar a perda de voláteis.

4.2 HS-SPME GC-MS

Para extração dos compostos por SPME, foi utilizada uma fibra de Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno/Carboxen (PDMS/DVB/CAR), posicionada no *headspace* do frasco de extração, à 35°C durante 30 minutos. Para a dessorção dos voláteis, utilizou-se um cromatógrafo a gás acoplado à um espectrômetro de massas (GC-MS) Shimadzu QP-2010 Plus, o qual possui um sistema de injeção automático para SPME Shimadzu AOC-5000 auto injector, sendo este equipamento

localizado na Central de Análises e Prospecção Química (CAPQ), no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (DQI/UFLA).

A dessorção da fibra no injetor ocorreu em modo Splitless, à 250°C, durante um minuto. Para fase móvel, utilizou-se gás Hélio com uma vazão de 1 mL/min. Já a temperatura do forno foi programada linearmente, iniciando à 40°C e aumentando 3°C/min até atingir 160°C, momento em que se começa a aumentar a temperatura em 20°C/min, até atingir 260°C, a mantendo constante por 2 minutos. O tempo da corrida cromatográfica totalizou 47 minutos. Para a fase estacionária foi utilizada uma coluna RTX-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

O espectrômetro de massas foi configurado no modo scan, na faixa de 40 a 350 m/z, submetido à uma temperatura de interface de 240°C, e a temperatura da fonte de íons em 200°C.

Para identificar os compostos, foi utilizado o software AMDIS, sendo possível comparar o espectro de massas obtido para cada pico eluído com espectros de massas de vários compostos disponíveis na biblioteca NIST. As identificações aceitas foram aquelas que apresentavam uma similaridade entre os espectros obtidos e os espectros da biblioteca NIST superior ou igual a 80%.

Para os cálculos de índices de retenção experimental utilizou-se uma mistura padrão de n-alcanos (Sigma-Aldrich C₆-C₂₀). O padrão desses alcanos foi injetado no sistema GC-MS nas mesmas condições das análises das amostras. Os índices de retenção de Kovats foram calculados a partir da Equação 4.1:

$$RI_x = 100 \left(k + \frac{\log(t'_{R,x}/t'_{R,k})}{\log(t'_{R,k+1}/t'_{R,k})} \right) \quad (4.1)$$

Os valores calculados foram comparados aos índices de retenção teóricos acessíveis no livro escrito por Adams (2017), em que desvios de até mais ou menos 10 unidades foram aceitos.

4.3 Análise quimiométrica

O cromatograma extraído foi o Cromatograma de Íons Totais (TIC), com 8290 pontos. A partir da obtenção dos dados, diversas ferramentas quimiométricas foram utilizadas para posterior extração de informações das amostras, desde pré-processamentos à construção de um modelo de classificação e sua interpretação. Para isso, softwares com o auxílio de programação foram utilizados. A matriz trabalhada possuía dimensões de 36 x 8000, sendo retirado os últimos 290 scans do cromatograma, uma vez que os compostos que eluem nessa região (após 45,39 min) não eram de interesse para a análise.

4.3.1 Softwares

Para execução e visualização dos algoritmos, dois softwares diferentes foram utilizados. Utilizou-se o MATLAB para execução do alinhamento de picos dos cromatogramas e o Jupyter Notebook, software que utiliza a linguagem de programação Python, para realização da correção de linha de base e demais análises estatísticas, utilizando de seu arsenal de bibliotecas especializadas.

Para identificação dos compostos foi utilizado o Software AMDIS, aliado da biblioteca NIST, a qual contém vários espectros de massas para comparação com o obtido em cada amostra.

4.3.2 Tratamento dos dados

Para a correção de linha de base, utilizou-se do algoritmo *Adaptive Iteratively Reweighted Penalized Least Squares* (airPLS). Com esse algoritmo, faz-se necessário definir dois parâmetros, os quais são otimizados experimentalmente, dessa maneira, os parâmetros utilizados para o airPLS que melhor atenderam às necessidades foram de $p = 0,1$ e para o achatamento $\lambda = 10^2$.

Após a correção de linha de base, foi necessário alinhar os cromatogramas. Para isso, foi utilizado o algoritmo Correlation Optimized Warping (COW). O

COW também utiliza de parâmetros para sua execução, os quais são otimizados experimentalmente, assim sendo, os parâmetros definidos experimentalmente e utilizados para o alinhamento foram de $Seg = 200$ e $Slack = 50$. O algoritmo COW foi aplicado sucessivas vezes. Primeiramente, alinhou-se as amostras entre seus próprios estilos. Após isso, alinhou-se as amostras entre sua origem, alinhando amostras da Cervejaria do Funil separadamente das amostras da cervejaria Joia Mesquita. Por fim, alinhou-se esses dois grupos juntamente.

4.3.3 Modelo PCA e de classificação

Um modelo PCA foi construído inicialmente. A intenção foi observar a distribuição das amostras e tentar reconhecer alguns padrões iniciais, para que assim, fosse possível conhecer melhor os dados de trabalho. Juntamente a construção do modelo PCA, foi calculada a variância explicada por cada componente principal, e em seguida foi observado o gráfico de *scores* das componentes principais 1 e 2.

O modelo de classificação escolhido para investigar e interpretar a fração volátil das amostras foi a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). Como o modelo é construído a partir de uma Regressão Linear por Mínimos Quadrados Parciais, o algoritmo utilizado para sua construção foi o de Mínimos Quadrados Parciais Iterativos Não-lineares (NIPALS). Para a matriz de classificação, necessária para a análise discriminante, utilizou-se para o vetor de resposta 1 representando amostras não pasteurizadas e 0 representando amostras Pasteurizadas.

4.3.4 Otimização do modelo

Para a otimização do modelo, foi utilizado a Leave One Out Cross-Validation (LOOCV), a qual é capaz de fornecer a informação do número ótimo de variáveis latentes a serem utilizadas para o modelo de classificação. A métrica utilizada foi

a porcentagem de acertos do modelo, sendo o modelo com mais acertos utilizado para posterior validação e interpretação.

4.3.5 Validação do modelo

Primeiramente, a fim de verificar a validação do modelo, foi executado um teste para validação do mesmo, utilizando como amostras de teste as mesmas amostras que foram utilizadas para calibração, uma vez que o resultado dessa etapa, apesar de não fornecer garantias de que o modelo está bom, fornece a informação de que o modelo não está ruim caso um mau resultado seja obtido, outras estratégias para melhorar o modelo deveriam ser feitas nas etapas de pré-processamento.

O modelo foi validado utilizando o modal Bootstrap. Primeiramente, as amostras são divididas randomicamente em 80% para treino e 20% para teste, após isso, a LOOCV foi calculada para o modelo e o modelo ótimo foi construído para previsão das amostras de teste. Feito isso, o mesmo processo foi repetido 20 vezes e a média da precisão do modelo foi calculada juntamente com o intervalo de confiança à um nível de confiança de 95%, a partir de um teste t.

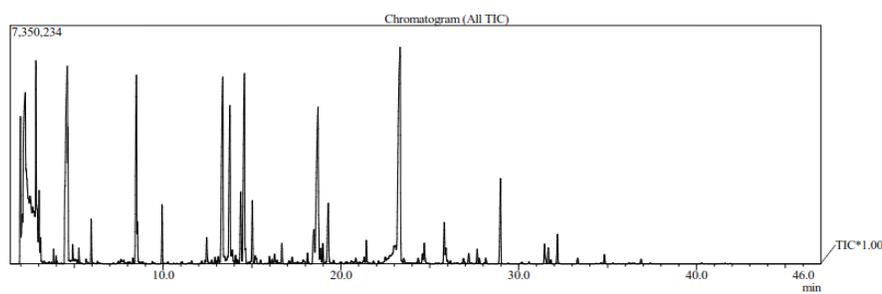
4.3.6 Interpretação do modelo

Foram utilizados os loadings do modelo, os quais fornecem informações importantes a respeito das variáveis, no caso, compostos, entretanto, dado o número de variáveis latentes em que o modelo foi construído, faz-se necessário utilizar outra ferramenta para identificar esses compostos. Assim sendo, também utilizou-se da Importância da Variável na Projeção (VIP) para identificar quais compostos são responsáveis pela separação. Assim sendo, a partir do cálculo dos VIPs, considerou-se que para um $VIP_j > 1$, a variável era considerada importante para a classificação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com a análise cromatográfica das 12 amostras em triplicata foram gerados cromatogramas de íons totais (TIC), em que um exemplo é apresentado na Figura 5.1. Estes cromatogramas apresentavam os dados que, posteriormente, foram processados e analisados a partir de modelos estatísticos.

Figura 5.1 – Cromatograma ilustrativo da primeira replicata da amostra de IPA não pasteurizada, visualizado por meio do software AMDIS.

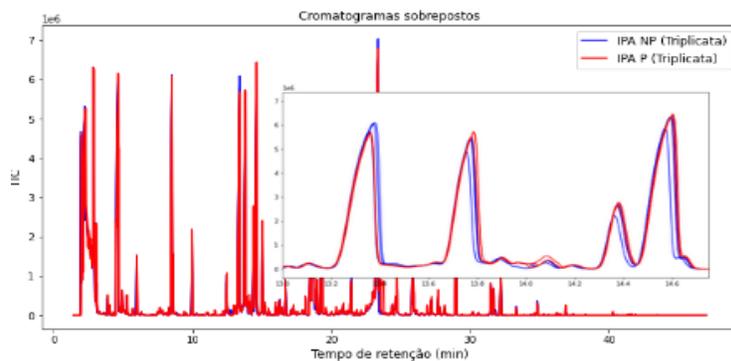


Fonte: Do autor (2022).

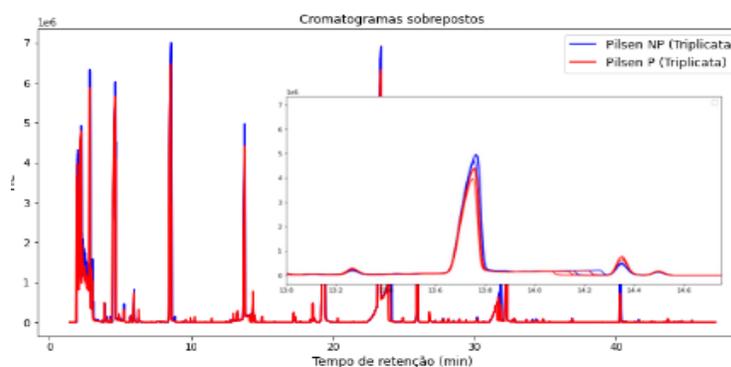
A partir dos cromatogramas gerados pela análise, foi possível observar algumas características dos dados trabalhados. É notório observar, a partir da Figura 5.2 a), que a variação entre amostras não pasteurizadas e pasteurizadas é pequena, porém, presente. Nota-se, a partir do zoom dado nos cromatogramas, que os picos podem variar para uma maior ou menor área.

Além disso, é importante salientar que algumas amostras, como as de Pilsen e Summer Ale, representam estilos de cerveja menos lupuladas. A Figura 5.2 b) apresenta cromatogramas de um desses estilos, evidenciando também que a diferença entre amostras não pasteurizadas e pasteurizadas é pequena. Porém, o mais importante é o fato de que é possível observar a diferença na presença de compostos entre estas amostras e amostras mais lupuladas. Os cromatogramas evidenciam que, muitos compostos presentes em cervejas mais lupuladas não estão presentes nesses estilos menos lupulados, ou então, estão em bem menor quantidade.

Figura 5.2 – a) Cromatogramas das replicatas das amostras de IPA não pasteurizada e pasteurizada. b) Cromatogramas das replicatas das amostras de Pilsen não pasteurizada e pasteurizada.



a)



b)

Fonte: Do autor (2022).

É importante notar a partir da observação dos cromatogramas que a maior variação presente nos dados provavelmente se dá pela diferença entre estilos, e não pelo processo de pasteurização. Este tipo de observação é importante pois, ao se analisar os dados quimiometricamente, essas variações serão levadas em conta, adicionando uma maior complexidade ao problema em questão.

Devido ao fato de que cervejas menos lupuladas e mais lupuladas apresentam diferenças relevantes quanto ao conteúdo volátil, é importante salientar que a pasteurização pode favorecer padrões diferentes a depender do estilo da cerveja. Por exemplo, um composto presente em amostras mais lupuladas, e que varia a

partir do processo de pasteurização, pode não variar em amostras menos lupuladas (a condicional é dada devido ao fato que também podem ser formados). Isso indica que a pasteurização pode afetar outro composto, se diferenciando de estilo para estilo, ou ao menos, de conjuntos de estilos para conjunto de estilos.

Assim sendo, os trabalhos realizados por Giannetti et al. (2019) e Lund et al. (2012) utilizaram amostras do mesmo estilo para realização da análise. Dessa maneira, grande parte da complexidade do problema acaba por ser contornado, uma vez que não é adicionado ao problema as variações referente aos estilos de cerveja. Entretanto, a utilização de diferentes estilos na análise fornecem resultados mais gerais, e conseqüentemente, mais fundamentais a respeito dos efeitos da pasteurização no perfil volátil.

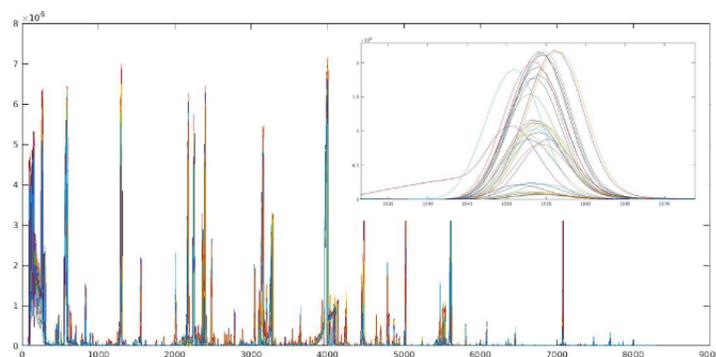
5.1 Alinhamento

O desalinhamento é um dos grandes problemas da análise quimiométrica quando se usa um cromatograma inteiro, pois oculta desvios químicos importantes. A Figura 5.3 a) mostra cromatogramas puros, sem qualquer processamento e alinhamento. É possível observar a partir do pico ampliado que há desvios um em relação aos outros, os quais podem prejudicar a qualidade do modelo quimiométrico a ser construído. Já na Figura 5.3 b) tem-se os cromatogramas alinhados, em que é possível perceber pelo mesmo pico ampliado a correção no desalinhamento.

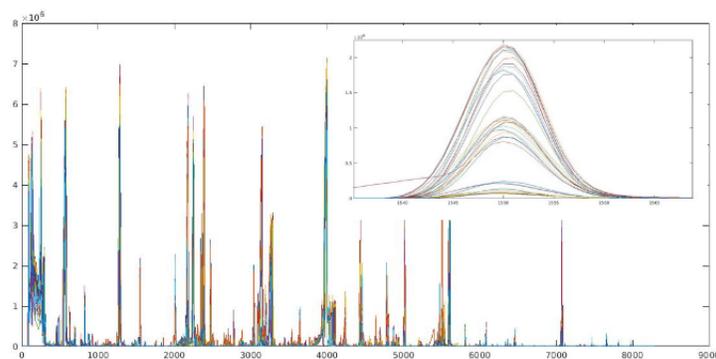
Esta correção permite elucidar os desvios químicos que poderiam estar sendo ocultados, dado o desvio do tempo de retenção do mesmo pico nos diferentes cromatogramas. Quando um modelo quimiométrico é criado a partir de cromatogramas desalinhados, é possível que este modelo interprete o mesmo composto duas vezes, como sendo compostos diferentes, prejudicando a interpretação química dos dados.

O desalinhamento de picos não é o único problema a ser enfrentado. O sangramento de colunas, ionização de fundo e variações do detector podem fazer

Figura 5.3 – a) Cromatogramas de íons totais de todas as amostras e suas respectivas replicatas sobrepostos, sem pré-processamento ou alinhamento. b) Após alinhamento utilizando o algoritmo COW.



a)



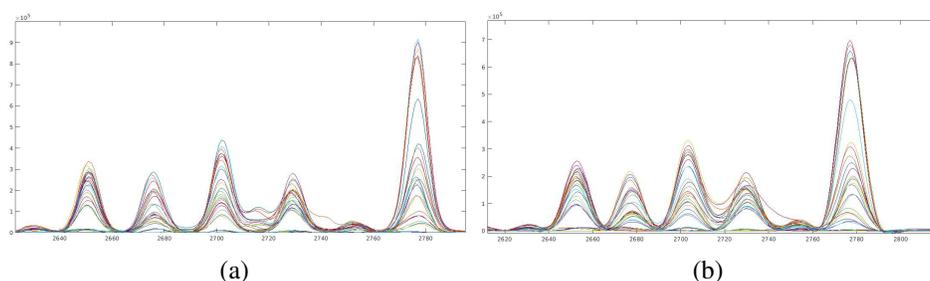
b)

Fonte: Do autor (2022).

com que picos menores sejam distorcidos e, conseqüentemente, terem sua variação ocultada (POOLE, 2021). Como a intenção futura é construir um modelo quimiométrico para extrair informações relevantes dos dados, a preocupação se faz necessária. Um modelo quimiométrico entende variações nos dados como informação. Desta maneira, picos menores podem variar tanto quanto picos maiores, assim sendo, elucidar sua variação é de suma importância. Para contornar este problema, a correção de linha base dos cromatogramas se apresenta como uma boa estratégia (POOLE, 2021).

A Figura 5.4 a) mostra alguns dos picos menores contidos nos cromatogramas, previamente alinhados. É possível observar que, apesar de alinhados, há uma leve distorção no seu formato, o que pode prejudicar uma posterior análise. Já a Figura 5.4 b) mostra os mesmos picos menores dos cromatogramas, também previamente alinhados, porém também com sua linha base corrigida pelo algoritmo airPLS. É possível notar que a correção de linha base corrige levemente o formato dos picos, fazendo com que se aproximem mais de uma curva gaussiana, que é o ideal.

Figura 5.4 – a) Cromatogramas sobrepostos e alinhados sem correção de linha base. b) Cromatogramas sobrepostos e alinhados com correção de linha base.



Fonte: Do autor (2022).

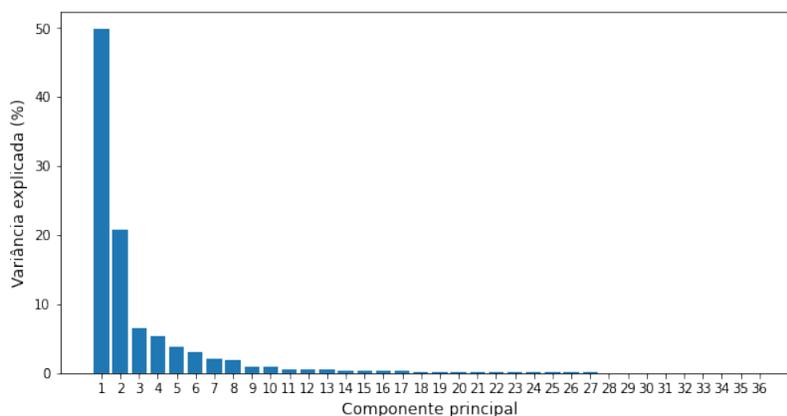
Portanto, a construção do modelo quimiométrico após a correção de linha base e alinhamento se torna muito mais adequado, uma vez que contornam problemas inerentes da análise cromatográfica.

5.2 Utilização da PCA para exploração dos dados

Com a PCA é possível realizar o reconhecimento de padrões entre amostras, sendo esta uma ferramenta bem consolidada para a exploração de um sistema de dados. Portanto, a princípio se construiu um modelo PCA com os dados de TIC, uma vez que o intuito seria compreender melhor como os dados variam, e assim, formular melhores estratégias para explorar o problema em questão. A Figura 5.5 mostra como se distribui a variância explicada por cada componente principal

do modelo construído. É notório observar que, a primeira componente principal explicou aproximadamente 50% da variância explicada, e a segunda componente principal, aproximadamente 20%, diminuindo rapidamente com o aumento das componentes principais.

Figura 5.5 – Gráfico de barras mostrando a variância explicada por cada componente principal.

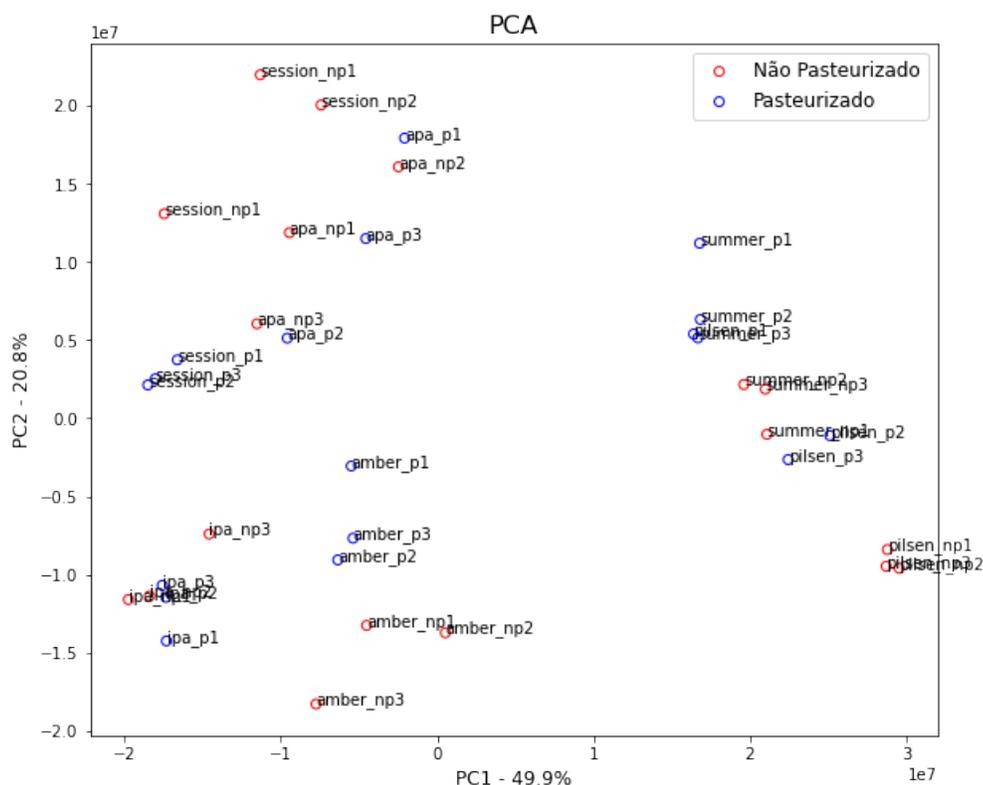


Fonte: Do autor (2022).

Dessa maneira, foi então construído o gráfico de *scores* da PCA para se observar como as amostras são distribuídas e agrupadas. Vale ressaltar que a PCA é um método não supervisionado, ou seja, nenhuma informação a respeito da classe que cada amostra pertence é fornecida, logo, qualquer agrupamento observado é espontâneo, moldado pela própria variação dos dados. A Figura 5.6 mostra o gráfico de *scores* do modelo PCA, sendo necessário para observar como as amostras se comportam. A partir da figura, é possível observar que não foram formados agrupamentos quanto as classes estudadas, que seriam de amostras não pasteurizadas ou pasteurizadas. Ao contrário disso, as amostras se agruparam por estilos de cerveja, implicando que a variação entre estilos é superior a variação entre amostras não pasteurizadas e pasteurizadas.

Esta observação era esperada, uma vez que ao trabalhar com amostras de cerveja de diferentes estilos, a maior variação está contida na diferença entre os

Figura 5.6 – Gráfico de *scores* da PCA construído com os dados de TIC das amostras pasteurizadas e não pasteurizadas.



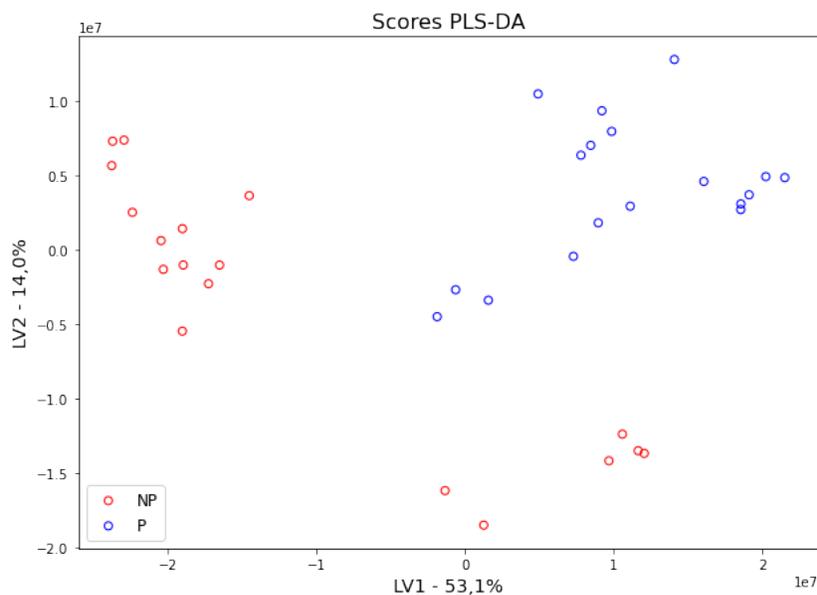
Fonte: Do autor (2022).

estilos, como explicitado anteriormente nas Figuras 5.2 a) e b), sobressaindo à possível variação observada relativa aos efeitos da pasteurização térmica. Além disso, como observado no trabalho publicado por Lund et al. (2012), a diferença esperada devido aos efeitos da pasteurização é pequena, ou seja, bem menor que a diferença entre estilos diferentes de cerveja. Portanto, tendo em vista a problemática, outros recursos devem ser utilizados para avaliar a variação referente ao processo de pasteurização. Tendo em vista que a variação é pequena, um modelo PLS-DA pode ser útil, uma vez que a construção do modelo leva em conta classes assinaladas pelo analista.

5.3 Selecionando variáveis com a PLS-DA

Um modelo PLS-DA foi construído a princípio, a partir dos dados de TIC. A PLS-DA é um modelo supervisionado, ou seja, para sua construção é levado em conta as classes estudadas pelo analista, o que permite observar com mais clareza a variação referente àquelas classes em específico. A princípio, um modelo PLS-DA é utilizado para classificar amostras, entretanto, o mesmo também permite uma exploração dos dados, analogamente a PCA. Tendo em vista isso, a Figura 5.7 mostra o gráfico de *scores* do modelo PLS-DA construído, onde é possível observar que, ao assinalar classes as amostras, houve um agrupamento entre classes. Apesar disso, nenhuma das variáveis latentes foi capaz de separar perfeitamente amostras não pasteurizadas das amostras pasteurizadas.

Figura 5.7 – Gráfico de *scores* da PLS-DA construído a partir dos valores de TIC das amostras pasteurizadas (P) e não pasteurizadas (NP).



Fonte: Do autor (2022).

Portanto, como dito que a PLS-DA a princípio é um modelo de classificação, otimizou-se e validou-se o modelo para observar sua capacidade de previsão

das amostras quanto as classes pertencentes. Para isso foi utilizado o método *Bootstrap*, em que as amostras são separadas em 80% para treino e 20% para teste, aleatoriamente, 20 vezes. O *Bootstrap* é o mais adequado para situações com poucas amostras, uma vez que tende a testar diversas configurações aleatórias, evitando o risco de superestimar ou subestimar o modelo por um separação de amostras. A cada vez, é calculado o número ótimo de variáveis latentes por meio da *Leave One Out Cross-Validation* (LOOCV), e em seguida, a capacidade de previsão do modelo é testada. A porcentagem de acertos obtida para o modelo foi de 73,35%, em que ao aplicar um teste *t* para calcular o intervalo de confiança, a um nível de 95% de confiança, tem-se $73,35\% \pm 7,14\%$.

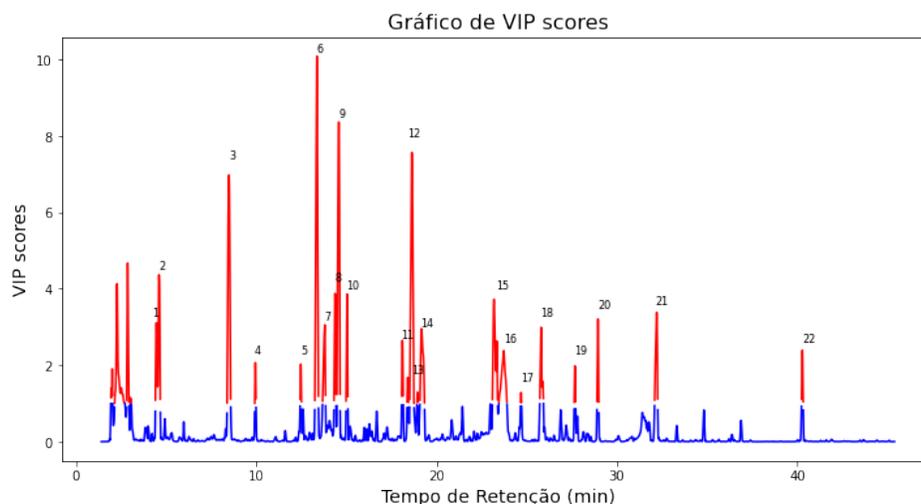
Para um modelo de classificação robusto, 73,35% de porcentagem de acertos é uma porcentagem inadequada, uma vez que há um erro considerável a se considerar nas previsões. É possível pensar que, o fato de a maior variância dos dados estar contida na diferença de estilos entre amostras pode estar prejudicando a classificação, ainda mais tendo em vista que a variância relativa ao processo de pasteurização é pequena. Portanto, o modelo PLS-DA construído pode não ser o mais adequado para se interpretar quimicamente os efeitos da pasteurização. Tendo em vista o exposto, a necessidade de se buscar uma melhor estratégia para explorar os efeitos da pasteurização se fez necessária.

Apesar de o modelo PLS-DA construído não ser o mais adequado para se explorar quimicamente, a partir dele é possível selecionar variáveis relevantes para entender os efeitos da pasteurização. Com essa seleção, a exploração se torna mais objetiva, indo direto aos picos que mais variam a partir do processo de pasteurização.

Dessa forma, para realizar a seleção de variáveis, calculou-se os Valores Importantes para a Projeção (*VIP scores*) do modelo PLS-DA construído. A Figura 5.8 mostra os valores obtidos para cada variável. O critério utilizado para aceitação ou não de uma variável consistiu em um limiar escolhido, que no caso em questão

segue: para variáveis com VIP calculado maior que 1, essa variável é considerada importante para o agrupamento observado no gráfico de $scores$ da PLS-DA.

Figura 5.8 – Gráfico de VIP scores calculados para cada variável, dispostos graficamente contra o tempo de retenção, em que a parte em vermelho tem-se $VIP_j > 1$, as quais foram numeradas em ordem crescente e aceitas como relevantes



Fonte: Do autor (2022).

É possível observar que os primeiros picos considerados importantes não foram utilizados. Isso foi feito pois estes picos representam possivelmente o Etanol e o Acetato de Etila, compostos estes muito voláteis e que estão sujeitos a maior variação pela SPME, técnica de extração utilizada. Além disso, estes compostos coeluem com o Dióxido de Carbono, dificultando então o cálculo posterior de suas áreas.

A redução de variáveis a partir desta técnica é expressiva, entretanto, quimicamente cada pico apresentado na Figura 4.8 representa um composto, em que cada pico apresenta diversas variáveis reconhecidas como importantes, sendo que essas variáveis estão altamente correlacionadas. A construção de um novo modelo PLS-DA para exploração química do sistema com essas variáveis dificultaria a interpretação a partir de seus *loadings*, pois seria necessário um conjunto de variáveis para representar apenas um composto químico. Assim sendo, faz-se necessá-

rio obter variáveis reduzidas que representem cada composto químico. Uma forma de contornar esta situação é identificar os compostos apresentados como relevantes no cálculo do *VIP scores* e calcular sua área, pois dessa maneira é possível obter uma única variável que represente um composto químico, além de também esta ser uma variável diretamente relacionada à concentração do composto em amostra.

Dessa forma, os compostos apontados como relevantes foram identificados na Tabela 5.1, em que os números de pico estão associados aos números apontados na Figura 5.8.

Tabela 5.1 – A tabela mostra os picos explicitados pelo cálculo do VIP como relevantes para agrupamento observado no modelo identificados, juntamente com seu tempo de retenção, índice de retenção experimental e teórico, além da similaridade de espectros de massa experimentais e da biblioteca NIST.

#	TR (min)	Composto	IR Exp.	IR Teo.	Match
1	4,524	3-Metil-1-butanol	732	734	920
2	4,574	2-Metil-1-butanol	735	738	944
3	8,462	Acetato de 3-metilbutila	874	872	944
4	9,925	Isobutirato de isobutila	914	913	958
5	12,444	Propanoato de 2-metilbutila	975	961	931
6	13,396	Mirceno	997	993	923
7	13,742	Hexanoato de etila	1005	998	936
8	14,347	Isobutirato de 3-metilbutila	1017	1017	934
9	14,523	Isobutirato de 2-metilbutila	1021	1014	960
10	15,035	4-Metilenohexanoato de metila	1030	-	818
11	18,109	Heptanoato de etila	1098	1089	945
12	18,659	Linalol	1102	1109	924
13	18,967	Isopentanoato de 2-metilbutila	1108	1107	937
14	19,264	Álcool feniletílico	1114	1126	953
15	23,378	Octanoato de etila	1197	1196	921
16	23,521	Ácido octanoico	1199	1194	928
17	24,698	Citronelol	1226	1223	922
18	25,831	Geraniol	1250	1249	913
19	27,674	2-Undecanona	1290	1296	951
20	28,972	Geranato de metila	1319	1322	926
21	32,216	Decanoato de etila	1391	1398	943
22	40,324	Dodecanoato de etila	1592	1597	902

Fonte: Do autor (2022)

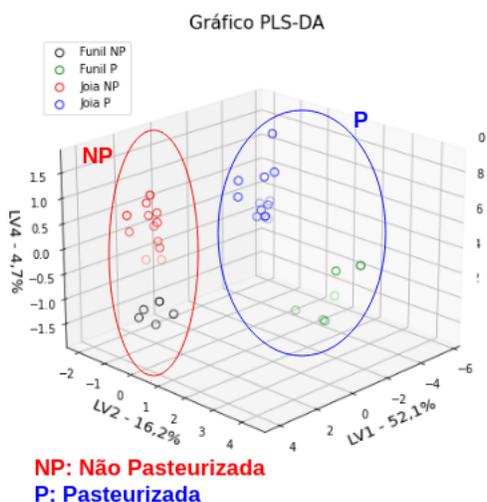
Sabendo o tempo de retenção dos compostos identificados, utilizando o software GCMSSolution foi possível integrar os picos para obtenção de suas áreas, para que assim se possa construir um modelo exploratório para observar o comportamento das variáveis importantes para descrever os efeitos do processo de pasteurização térmica.

5.4 Construção e interpretação do modelo exploratório PLS-DA com dados de área

Com os dados de área calculado para cada composto avaliado como importante pelo cálculo do *VIP scores* construiu-se um modelo PLS-DA com fins exploratórios. Um gráfico tridimensional, apresentado na Figura 5.9 utilizando as variáveis latentes 1, 2 e 4, foi rotacionado de forma que observou-se agrupamentos entre amostras. Vale ressaltar que, diferentemente do modelo PLS-DA construído anteriormente, em que foram utilizadas 8000 variáveis de TIC, agora foram utilizadas apenas 22 variáveis de área.

É possível observar que há uma separação entre amostras pasteurizadas e não pasteurizadas, ressaltando que o processo afeta o perfil químico das amostras. Entretanto, outra importante observação a ser feita é a de que há uma separação entre amostras provenientes da cervejaria Joia Mesquita e Cervejaria do Funil. Vale ressaltar que o perfil dos estilos provenientes de cada cervejaria são significativamente diferentes, sendo as amostras provenientes da cervejaria Joia Mesquita pertencentes a estilos de cerveja mais lupulados, e as da Cervejaria do Funil estilos de cerveja menos lupulados. Esta diferença reforça a ideia de que o modelo irá capturar informações diferentes para os grupos, pois é notório que há diferença entre os compostos presentes em cervejas mais lupuladas e menos lupuladas. Ou seja, é provável que os efeitos da pasteurização em amostras com mais lúpulo sejam diferentes das amostras com pouco lúpulo.

Figura 5.9 – Gráfico de *scores* do modelo PLS-DA exploratório construído a partir dos dados de área, em que os compostos avaliados são apenas os apontados como importantes pelo cálculo de *VIP scores*.

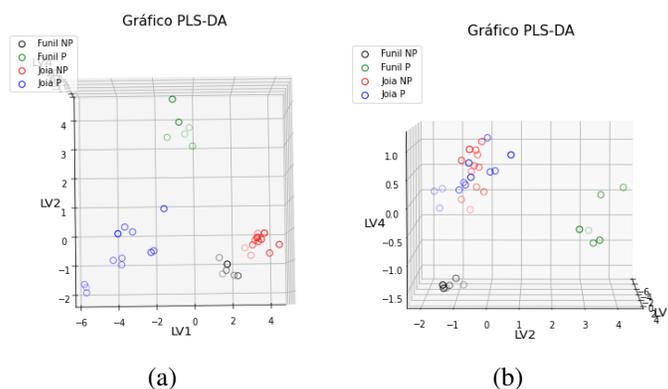


Fonte: Do autor (2022).

Rotacionando o gráfico de forma a observar como as amostras se comportam em LV1 vs LV2 e LV2 vs LV4 é possível observar algumas características destes agrupamentos. A Figura 5.10 evidencia este comportamento a partir da rotação da Figura 5.9.

É possível notar através da Figura 5.10 a) que as amostras não pasteurizadas da cervejaria Joia Mesquita e Cervejaria do Funil se agrupam e se separam das amostras pasteurizadas da Joia Mesquita pela LV1, enquanto se agrupam para se diferenciar das amostras pasteurizadas da Cervejaria do Funil pela LV2. Enquanto isso, é possível notar pela Figura 5.10 b) que todas as amostras da cervejaria Joia Mesquita se agrupam de forma a se separar das amostras não pasteurizadas da Cervejaria do funil pela LV4. Portanto, a exploração química deste sistema se dá em cima dessas considerações, pois com a análise dos *loadings* do modelo, o objetivo é observar efeitos da pasteurização, e não observar variações inerentes a diferença de estilo das cervejas. Isto posto, a Figura 5.11 apresenta os *scores* e os *loadings*

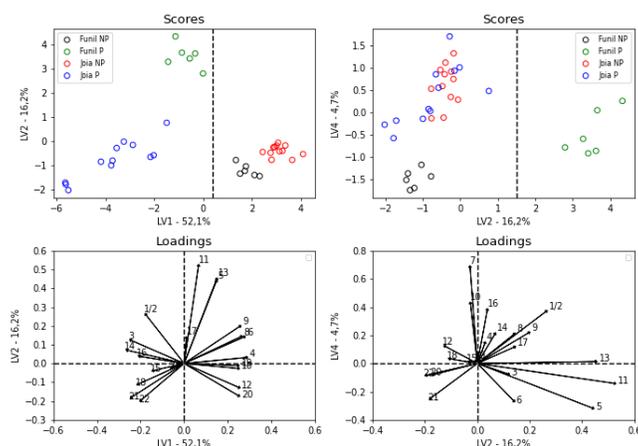
Figura 5.10 – (a) Rotação do modelo tridimensional para observar LV1 vs LV2 (b) Rotação do modelo tridimensional para observar LV2 vs LV4.



Fonte: Do autor (2022).

dos gráficos LV1 vs LV2 e LV2 vs LV4, sendo possível avaliar a contribuição dos compostos para os agrupamentos observados.

Figura 5.11 – Projeções bidimensionais do modelo PLS-DA, em que estão dispostos os gráficos de *scores* e de *loadings* da LV1 vs LV2 e LV2 vs LV4.

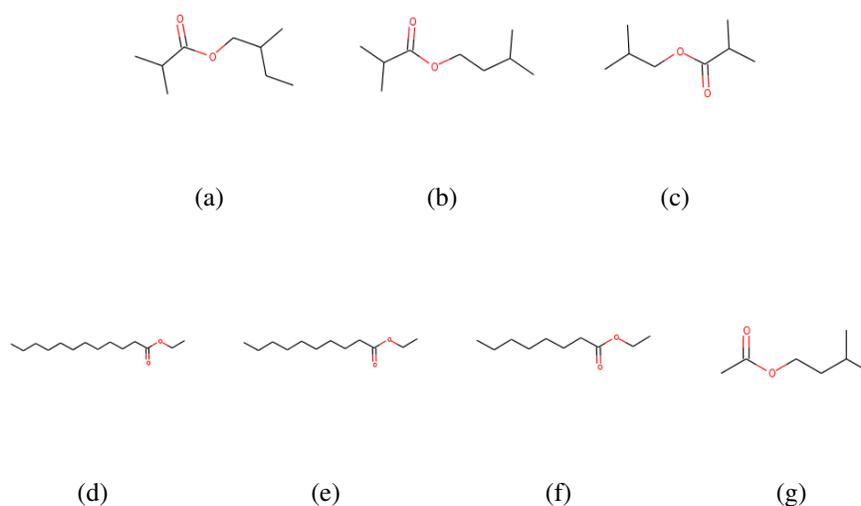


Fonte: Do autor (2022).

Analisando as contribuições para o agrupamento observado pela LV1, a partir da Figura 5.11 é possível observar ésteres mais intensos em ambos os agrupamentos, entretanto, os ésteres mais intensos nas amostras não pasteurizadas apresentam cadeia mais ramificada próximo ao grupo funcional. Já para os és-

teres mais presentes no agrupamento de amostras pasteurizadas, temos em geral ésteres de cadeia menos ramificada, com exceção do acetato de 3-metilbutila (3). A partir da Figura 5.12 é possível observar a estrutura dos ésteres mais importantes quanto a sua contribuição para o agrupamento observado na LV1.

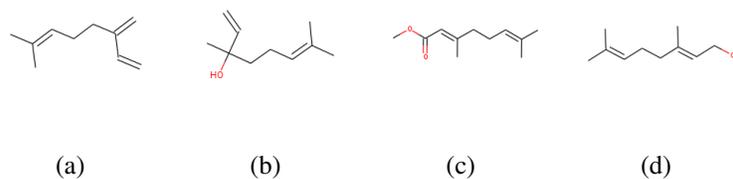
Figura 5.12 – (a), (b) e (c) são ésteres de cadeia mais ramificada, mais presentes em não pasteurizadas. (d), (e), (f) e (g) são ésteres com cadeia menos ramificada, mais presentes em pasteurizadas.



Fonte: NIST (2022)

Para os constituintes do óleo essencial do lúpulo, tem-se o disposto na Figura 5.13 como observados pela LV1.

Figura 5.13 – (a) Mirceno (6), (b) Linalol (12) (c) Geranato de Metila (20), (d) Geraniol (18). São constituintes do óleo essencial do lúpulo observados pela LV1.

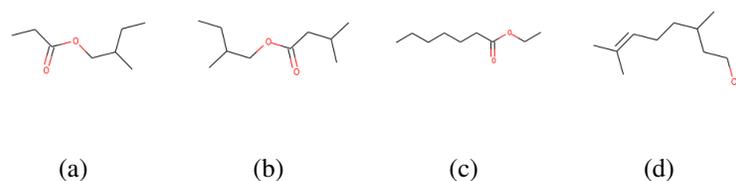


Fonte: NIST (2022)

Foi observado maior intensidade de Mirceno (6), Linalol (12) e Geranato de Metila (20) no agrupamento não pasteurizado, enquanto o agrupamento pasteurizado apresenta maior intensidade de Geraniol (18). A Figura 5.13 mostra a estrutura destes compostos.

Avaliando a LV2, tem-se que o Heptanoato de Etila (11), Propanoato de 2-metilbutila (5), Isopentanoato de 2-metilbutila (13) e Citronelol (17) são os maiores responsáveis pela distinção entre os dois grupos, apresentando vetores com grande contribuição nessa variável latente, com exceção do Citronelol, que apresenta um vetor de menor intensidade. Dado o sentido positivo dos vetores na LV2, infere-se que estes compostos estão mais presentes em amostras pasteurizadas da Cervejaria do Funil. As estruturas dos compostos são dadas na Figura 5.14. Além disso, dado a maior presença dos três ésteres citados em amostras pasteurizadas da Cervejaria do Funil, é possível começar a identificar uma tendência de formação desta classe de compostos.

Figura 5.14 – (a) Isopentanoato de 2-metilbutila (13), (b) Propanoato de 2-metilbutila (5) (c) Heptanoato de Etila (11), (d) Citronelol (17). Estes são os compostos mais importantes na LV2



Fonte: NIST (2022)

Ao analisar a separação de agrupamentos promovida pela LV4, tem-se que o Mirceno possui uma relevante contribuição nesta separação, sendo indicado como mais presente em amostras não pasteurizadas da Cervejaria do Funil. Entretanto, dado que amostras pasteurizadas e não pasteurizadas da cervejaria Joia Mesquita estão agrupadas separado das amostras da Cervejaria do Funil, muitos compostos acabam por se mostrar mais presentes neste agrupamento. Essa ob-

servação era esperada, uma vez que as amostras provenientes da cervejaria Joia Mesquita contemplam estilos mais lupulados. Tendo em vista que muitos desses componentes estão relacionados ao lúpulo, é notório que estejam mais presentes nas mesmas.

A Tabela 5.2 apresenta um resumo de como os compostos apresentados como importantes variaram devido ao processo de pasteurização, em que as tendências foram observadas.

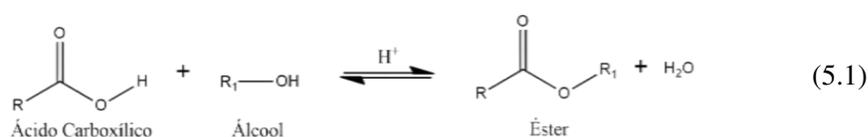
Tabela 5.2 – Resumo da variação dos compostos. NP indica Não Pasteurizado e P Pasteurizado. O "X" assinalado indica em qual classe o composto se encontra mais presente.

#	Composto	NP	P
1	3-Metil-1-butanol		X
2	2-Metil-1-butanol		X
3	Acetato de 3-metilbutila		X
4	Isobutirato de isobutila	X	
5	Propanoato de 2-metilbutila		X
6	Mirceno	X	
7	Hexanoato de etila		X
8	Isobutirato de 3-metilbutila	X	
9	Isobutirato de 2-metilbutila	X	
10	4-Metilenohexanoato de metila	X	
11	Heptanoato de etila		X
12	Linalol	X	
13	Isopentanoato de 2-metilbutila		X
14	Álcool feniletílico		X
15	Octanoato de etila		X
16	Ácido octanoico		X
17	Citronelol		X
18	Geraniol		X
19	2-Undecanona	X	
20	Geranato de metila	X	
21	Decanoato de etila		X
22	Dodecanoato de etila		X

Fonte: Do autor (2022)

5.4.1 Entendendo os Ésteres

A esterificação pode ocorrer a partir de diversos processos, entretanto, um dos mais conhecidos é a esterificação de Fischer, a qual envolve o aquecimento de uma mistura de ácidos carboxílicos e álcoois (KHAN et al., 2021). A Equação 5.1 mostra o esquema geral deste processo de esterificação.



Fonte: Khan et al. (2021)

O meio químico da cerveja apresenta diversos álcoois e ácidos carboxílicos, o que confere um caráter ácido a bebida, sendo este um ambiente adequado para que processos como a esterificação de Fischer ocorra. Dessa forma, é notório a possibilidade deste tipo de reação ocorrer durante o processo de produção da cerveja. Entretanto, também é possível que o processo de pasteurização térmica tenha acelerado este tipo de reação, uma vez que o aquecimento favorece sua ocorrência (KHAN et al., 2021).

Vale ressaltar que, apesar da esterificação de Fischer explicar os ésteres que foram observados em maior quantidade nas amostras de cerveja pasteurizadas, não é explicado o porquê de alguns ésteres aparecerem em maior quantidade em amostras não pasteurizadas. A esterificação de Fischer geralmente ocorre em condições de excesso do álcool adicionado à cadeia do ácido carboxílico (KHAN et al., 2021). Dessa maneira, caso contrário, o éster presente ou formado pode seguir o inverso da Equação 5.1, em que o éster sofre uma hidrólise catalisada pelo meio ácido (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018). Além disso, os fatores estéricos afetam fortemente as reações de esterificação, em que grandes grupos presentes próximos ao local da reação, seja no componente do álcool ou do

ácido carboxílico, desfavorecem a esterificação de Fischer, podendo fazer com que outros tipos de reação sejam mais favoráveis, como reações de eliminação (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018). Dessa maneira, como a Equação 5.1 descreve um equilíbrio, o processo de pasteurização pode estar favorecendo tanto o sentido direto quanto inverso da reação, em que este favorecimento depende da concentração dos álcoois e ácidos, além de suas estruturas, em cada estilo de cerveja.

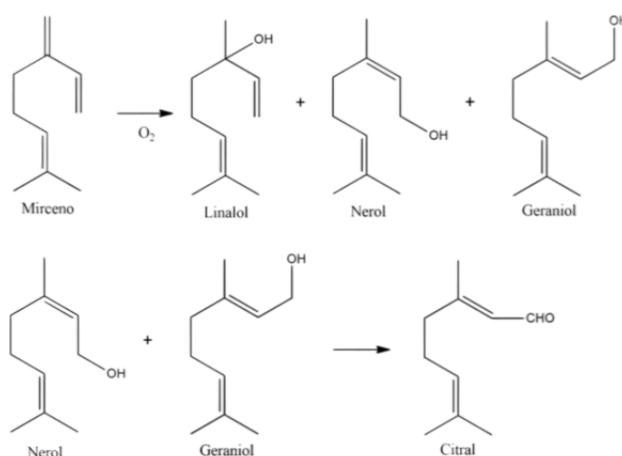
É possível notar pela Figura 5.13 que os ésteres indicados como mais presentes em amostras não pasteurizadas pela LV1, são ésteres provenientes tanto de álcoois, como também de ácidos carboxílicos, que possuem maior ramificação em suas cadeias carbônicas, característica essa que pode estar favorecendo outro tipo de reação, ou o inverso da esterificação de Fischer. Já os ésteres apontados como mais presentes em amostras pasteurizadas pela LV1 são provenientes de álcoois e ácidos carboxílicos com cadeia carbônica menos ramificadas, o que pode estar favorecendo sua formação através do processo de pasteurização térmica.

É observado pela LV2, a partir da Figura 5.12, que há também uma maior presença de ésteres em amostras pasteurizadas provenientes de álcoois e ácidos carboxílicos com maior quantidade de ramificações. Entretanto, estes compostos diferenciam apenas as amostras pasteurizadas da Cervejaria do Funil de todas as outras, indicando que talvez o meio reacional destas cervejas menos lupuladas tenham melhores condições para formação destes ésteres, apesar de menor favorecimento estérico, como maior excesso dos álcoois geradores. Além disso, as cervejas menos lupuladas, provenientes da Cervejaria do Funil, possuem menos compostos na fração volátil quando comparadas às amostras mais lupuladas da cervejaria Joia Mesquita. Assim sendo, uma ausência de compostos para ocorrência de outros tipos de reações pode também estar favorecendo a esterificação de Fischer.

5.4.2 Entendendo os Terpenos

Foram observados cinco terpenos atuando de forma relevante para diferenciar amostras de cerveja quanto ao processo de pasteurização. Entre estes terpenos, tem-se o Mirceno, Linalol, Geraniol, Citronelol e Geranato de Metila. O Mirceno é um monoterpene acíclico (BEHR; JOHNEN, 2009), encontrado comumente na fração volátil de cervejas, dos mais variados estilos, uma vez que este é um dos constituintes do óleo essencial do lúpulo (HIERONYMUS, 2012). A partir da oxidação do Mirceno pelo ar, como mostrado na Figura 5.15, é possível gerar diversos outros terpenos, como por exemplo, o Linalol, o Geraniol e o Nerol (DIECKMANN; PALAMAND, 1974).

Figura 5.15 – Produtos de auto oxidação do Mirceno.



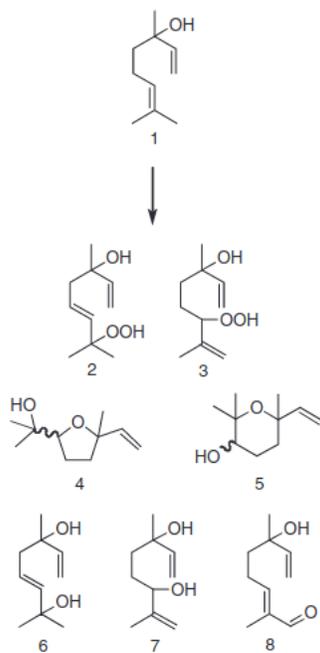
Fonte: Dieckmann e Palamand (1974)

Além disso, também é possível que a auto oxidação do Mirceno leve a rotas que produzam Citronelol (BEHR; JOHNEN, 2009). Dado que o Mirceno foi observado em maior quantidade nas amostras não pasteurizadas, é possível inferir que a auto oxidação do Mirceno presente foi favorecido pelo processo de pasteurização térmica, gerando outros produtos no meio químico da cerveja. Além disso, também foi observado que o Geraniol, assim como o Citronelol, se apresentam em maior quantidade em amostras pasteurizadas. Assim sendo, tendo em vista

que estes são produtos da oxidação do Mirceno pelo ar, a observação corrobora a indução da auto oxidação do Mirceno pelo processo de pasteurização térmica.

O Linalol, que também constitui um dos produtos gerados pela oxidação do Mirceno pelo ar, foi observado em maior quantidade em amostras não pasteurizadas, indicando que a formação deste terpeno não foi favorecido pela pasteurização térmica, e sim que o Linalol presente ou formado fora convertido em outro produto a partir de outro processo. Dito isso, o Linalol também pode sofrer processos de oxidação, gerando óxidos de Linalol (HIERONYMUS, 2012), como mostrado na Figura 5.16, os vários possíveis produtos. Assim sendo, esta rota pode ter sido favorecida durante a pasteurização térmica, porém, nenhum óxido de Linalol foi identificado como relevante pelo modelo estatístico para a diferenciação das amostras.

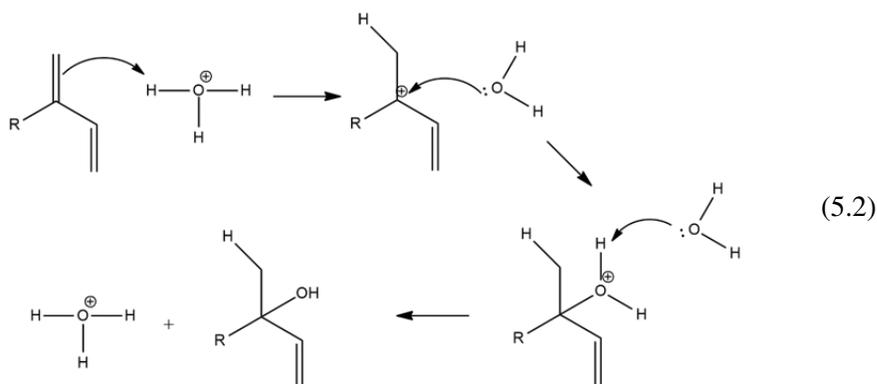
Figura 5.16 – Produtos de auto oxidação do Linalol.



Fonte: Christensson et al. (2010)

Dado a variedade de produtos gerados pela auto oxidação do Linalol, é possível que a variação de produção destes produtos não tenha sido tida como importante. Entretanto, a redução da quantidade de Linalol para produzir toda essa gama de produtos foi captada pelo modelo estatístico, o que remete a possibilidade do processo de pasteurização térmica estar induzindo a auto oxidação deste composto. Outra possível explicação para não observação destes compostos nos cromatogramas é a de que, pelo fato de a maioria serem dióis, estes compostos possuem maior temperatura de ebulição, logo podem não ter sido extraídos pela fibra utilizada na técnica de SPME.

Apesar da oxidação poder ocorrer devido a presença de oxigênio, no meio reacional da cerveja, essa não seria a única rota possível. A adição de água catalisada por um meio ácido à ligação dupla de um alceno (hidratação direta do alceno) é um método de preparação de álcoois de baixo peso molecular (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018). A equação 5.2 descreve o mecanismo de reação desse processo de oxidação.

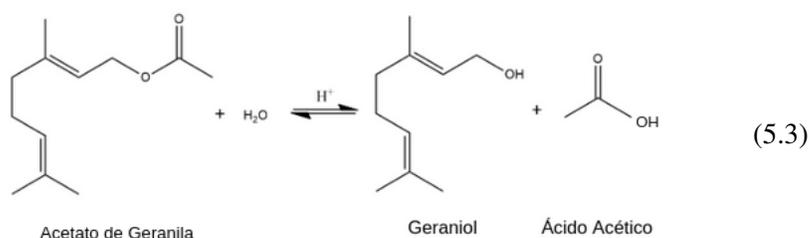


Fonte: Solomons, Fryhle e Snyder (2018)

Essas reações são geralmente regiosseletivas, e a adição de água à ligação dupla segue a regra de Markovnikov (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018). Assim sendo, a hidratação direta de alcenos catalisada por ácido não gera álcoois

primários, exceto no caso do eteno (SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018). Portanto, dado que o meio reacional da cerveja é aquoso e ácido, pode-se inferir a possibilidade de que o Mirceno e o Linalol também estejam sendo oxidados por meio da rota apresentada.

Foi observado também que o Geranato de Metila se encontra mais presente em amostras não pasteurizadas, contrário do esperado, o qual seria uma maior quantidade de Geraniol em amostras não pasteurizadas, uma vez que este é um composto bastante presente no lúpulo (FORSTER; GAHR; OPSTAELE, 2014). Um estudo publicado por Peacock et al. (1981) indicou que é provável que a maior parte do Geraniol presente em cerveja seja fruto da hidrólise de ésteres de Geraniol, e não do Geraniol originalmente presente no lúpulo. Posteriormente, o trabalho publicado por Forster, Gahr e Opstaele (2014) avaliou o conteúdo de Acetato de Geraniol em relação ao Geraniol em cervejas, em que de acordo com a Equação 5.3 propôs como estaria ocorrendo a produção de Geraniol a partir do Acetato de Geraniol.

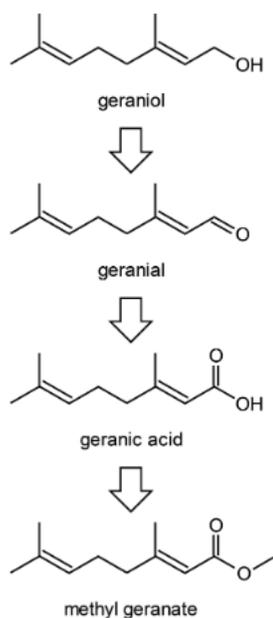


Fonte: Forster, Gahr e Opstaele (2014)

Outro estudo publicado por Sanekata et al. (2018), o qual apresentou o Ácido Gerânico, composto derivado do Geraniol, como composto importante para o sabor de cervejas, apresenta também uma proposta a respeito de como derivados do Geraniol são produzidos nas plantas. A possibilidade apresentada indica que, a biossíntese de derivados do Geraniol no lúpulo segue por: oxidação do Geraniol

a Geranial, que é subsequentemente oxidado a Ácido Gerânico, que por fim é esterificado a Geranato de Metila. A Figura 5.17 apresenta o esquema geral deste processo.

Figura 5.17 – Possível rota de biossíntese do Geraniol, Geranial, Ácido Gerânico e Geranato de Metila em plantas.



Fonte: Sanekata et al. (2018)

Portanto, não foi encontrado nenhuma hipótese a respeito de como o Geranato de Metila poderia ser convertido a Geraniol de forma natural. Dessa maneira, é necessário um maior aprofundamento a respeito destes dois compostos para que se possa observar possíveis rotas que expliquem o observado. Tendo em vista o citado, é de difícil conclusão assegurar quais reações em específico estariam ocorrendo para gerar o observado.

6 CONCLUSÃO

A partir da investigação dos efeitos da pasteurização no perfil volátil de cervejas dos mais diversos estilos, foi possível afirmar, primeiramente, que a pasteurização afeta o perfil volátil de cervejas, entretanto, a variação é pequena. Além disso, foi possível também observar que a variação de ésteres e constituintes do óleo essencial do lúpulo são as classes de compostos mais importantes para explicar a diferenciação.

O trabalho evidenciou também a dificuldade de se trabalhar com variados estilos de cerveja, uma vez que a partir das análises feitas, foi possível observar que diferentes estilos de cerveja variam de forma diferente após submetidos ao processo de pasteurização. Dessa maneira, alguns resultados que parecem contraditórios podem ser fruto da complexidade enfrentada, posta também pela variedade de estilos entre amostras.

A utilização de apenas um estilo de cerveja facilita a observação de variações induzidas ou favorecidas pela pasteurização. Entretanto, geram resultados e conclusões menos generalizados. Assim sendo, apesar de toda a complexidade das amostras e do problema analisado, foi possível observar importantes variações no perfil volátil de cervejas artesanais submetidas ao processo de pasteurização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **IDENTIFICATION OF ESSENTIAL OIL COMPONENTS BY GAS CHROMATOGRAPHY/MASS SPECTROMETRY**. 4.1. ed. [S.l.]: Allured publishing, 2017.

AFANADOR, N.; TRAN, T.; BUYDENS, L. Use of the bootstrap and permutation methods for a more robust variable importance in the projection metric for partial least squares regression. **Analytica Chimica Acta**, v. 768, 2013.

AUGUSTO, F. Cromatografia a gás: Curso em diapositivos. **Chemkeys**, 2000.

BEHR, A.; JOHNEN, L. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: A critical review. **ChemSusChem**, p. 1072–1095, 2009.

BOS, T. S. et al. Recent applications of chemometrics in one- and two-dimensional chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 9-10, p. 1138–1146, 2020.

BRERETON, R. G.; LLOYD, G. R. Partial least squares discriminant analysis for chemometrics and metabolomics: How scores, loadings, and weights differ according to two common algorithms. **Journal of Chemometrics**, v. 32, 2018.

BUZRUL, S. A suitable model of microbial survival curves for beer pasteurization. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 1330–1336, 2007.

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.

CAZES, J. **Encyclopedia of Chromatography**. Supplement. [S.l.]: CRC Press, 2001. ISBN 9780824721534; 0824721535.

CHONG, I.-G.; JUN, C.-H. Performance of some variable selection methods when multicollinearity is present. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 78, 2005.

CHRISTENSSON, J. B. et al. Linalool – a significant contact sensitizer after air exposure. **Contact dermatitis**, v. 62, n. 1, 2010.

DENG, Y. et al. Influence of ultrasound assisted thermal processing on the physicochemical and sensorial properties of beer. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 40, p. 166–173, 2018.

DIECKMANN, R. H.; PALAMAND, S. R. Autoxidation of some constituents of hops. i. the monoterpene hydrocarbon, myrcene. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 22, n. 3, 1974.

EILERS, P. H. C.; BOELEN, H. F. M.; HANKEMEIER, T. Sign constraints improve the detection of differences between complex spectral data sets: Lc-ir as an example. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 24, p. 7998–8007, 1922.

FORSTER, A.; GAHR, A.; OPSTAELE, F. V. On the transfer rate of geraniol with dry hopping. **BrewingScience**, v. 67, n. 3, 2014.

GIANNETTI, V. et al. Flavour component analysis by hs-spme/gc–ms and chemometric modeling to characterize pilsner-style lager craft beers. **Microchemical Journal**, v. 149, 2019.

HIERONYMUS, S. **For the Love of hops**. [S.l.]: Brewers Association, 2012. ISBN 1-938-469-01-1.

KHAN, Z. et al. Current developments in esterification reaction: A review on process and parameters. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, p. 80–101, 2021.

LANCIONI, C. et al. Headspace solid-phase microextraction: Fundamentals and recent advances. **Advances in Sample Preparation**, v. 3, 2022.

LUND, M. N. et al. Effect of pasteurization on the protein composition and oxidative stability of beer during storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 1236212370, 2012.

MAGNUSSON, M. et al. Bayesian leave-one-out cross-validation for large data. **Proceedings of Machine Learning Research**, v. 97, p. 4244–4253, 2019.

MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M.; SNOW, N. H. **Basic Gas Chromatography**. 3. ed. [S.l.]: John Wiley and Son, 2019.

NIST. **Search for Species Data by Chemical Name**. 2022. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser/>>.

PEACOCK, V. E. et al. Floral hop aroma in beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, p. 1265–1269, 1981.

POELMANS, E.; SWINNEN, J. F. From monasteries to multinationals (and back): A historical review of the beer economy. **Journal of Wine Economics**, Cambridge University Press, v. 6, n. 2, p. 196–216, 2011.

POOLE, C. **Gas Chromatography**. 2. ed. [S.l.]: Elsevier, 2021. (Handbooks in Separation Science). ISBN 0128206756; 9780128206751.

SANEKATA, A. et al. Identification and characterization of geranic acid as a unique flavor compound of hops (*Humulus lupulus L.*) variety sorachi ace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, p. 1228512295, 2018.

SILVA, G. A.; AUGUSTO, F.; POPPI, R. J. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by hs-spmc-gc. **Food Chemistry**, p. 1057–1063, 2008.

SOLOMONS, T. G.; FRYHLE, C. B.; SNYDER, S. A. **Química Orgânica**. 12. ed. [S.l.]: LTC - Livro técnicos e científicos editora, 2018. v. 2. ISBN 978-85-216-3548-2.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Gc-ms: Más de un analizador de masas, ¿para qué? **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 4, p. 25–48, 2010.

STEELE, J. H. History, trends, and extent of pasteurization. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 217, n. 2, p. 175–178, 2000.

UNGER, R. W. **Beer in the Middle Ages and the Renaissance**. [S.l.]: University of Pennsylvania Press, 2004. ISBN 0812219996; 9780812219999; 9780812237955; 0812237951.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, n. 4, 2000.

WHITTAKER, E. T. On a new method of graduation. **Proceedings of the Edinburgh Mathematical Society**, Cambridge University Press, v. 41, p. 63–75, 1922.

WONG, T.-T. Performance evaluation of classification algorithms by k-fold and leave-one-out cross validation. **Pattern Recognition**, v. 48, n. 9, p. 2839–2846, 2015.

WYNNE, R. D. I. T. P. J. **A Natural History of Beer**. Hardcover. [S.l.]: Yale University Press, 2019. ISBN 0300233671; 9780300233674.

ZHANG, Z.-M.; CHEN, S.; LIANG, Y.-Z. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. **The Analyst**, p. 1138–1146, 2010.