



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



Glaucimar Alex Passos de Resende

**Impacto da suplementação de micronutrientes em cervejas e
análise de voláteis em cervejas e lúpulos por cromatografia
gasosa bidimensional abrangente**

Belo Horizonte

2024

UFMG/ICEx/DQ. 1607

T. 733

GLAUCIMAR ALEX PASSOS DE RESENDE

**Impacto da suplementação de micronutrientes em cervejas e
análise de voláteis em cervejas e lúpulos por cromatografia
gasosa bidimensional abrangente**

Tese apresentada ao Departamento de
Química do Instituto de Ciências Exatas da
Universidade Federal de Minas Gerais
como requisito parcial para a obtenção do
grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientador: Prof. Bruno G. Botelho
Colaboradores: Prof. Ricardo M. Orlando
Prof. Philip Marriott

Belo Horizonte

2024

Ficha Catalográfica

R433i
2024
T

Resende, Glaucimar Alex Passos de.
Impacto da suplementação de micronutrientes em cervejas e análise de voláteis em
cervejas e lúpulos por cromatografia gasosa bidimensional abrangente [manuscrito] /
Glaucimar Alex Passos de Resende. 2024.
213 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Bruno Gonçalves Botelho.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de
Química.
Bibliografia: f. 159-171.
Apêndices: f. 172-213.

1. Química analítica – Teses. 2. Micronutrientes – Teses. 3. Cerveja – Teses. 4.
Cromatografia de gás – Teses. 5. Extração (Química) – Teses. 6. Análise de
componentes principais – Teses. 7. Espectrometria de massas – Teses. 8. Preparação de
amostra (Química) – Teses. I. Botelho, Bruno Gonçalves, Orientador. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Impacto da Suplementação de Micronutrientes em Cervejas e Análise de Voláteis em Cervejas e Lúpulos por Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente"

Glaucimar Alex Passos de Resende

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Bruno Gonçalves Botelho - Orientador
UFMG

Profa. Vânia de Lourdes das Graças Teles
UFAL

Prof. Marcio Pozzobon Pedroso
UFLA

Profa. Jacqueline Aparecida Takahashi
UFMG

Profa. Adriana Nori de Macedo
UFMG

Belo Horizonte, 29 de abril de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Vânia de Lourdes das Graças Teles, Usuário Externo**, em 29/04/2024, às 18:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcio Pozzobon Pedroso, Usuário Externo**, em 02/05/2024, às 11:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Goncalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 02/05/2024, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior**, em 03/05/2024, às 09:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jacqueline Aparecida Takahashi, Professora do Magistério Superior**, em 10/05/2024, às 19:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3208318** e o código CRC **4D0CB5EF**.

Agradecimentos

Aos meus pais que são meus grandes exemplos de vida e responsáveis por grande parte da minha trajetória. Aos meus irmãos Josi e Glauciano por sempre estarem ao meu lado e serem um porto seguro em minha vida.

Ao meu orientador Bruno Botelho por todos seus ensinamentos, colaboração para o meu amadurecimento na carreira científica, parceria durante ao longo do processo nesses anos e incentivo para meu desenvolvimento como profissional.

Ao professor Ricardo Orlando pela parceria, ensinamentos, por sempre estar aberto a discussões acadêmicas engrandecedoras, e a todo cuidado e incentivo no meu crescimento como profissional.

Ao meu supervisor na Austrália Philip Marriott. *There are not enough words to say how thankful I am for having the experience of being part of your group and that I'm keeping all the learning experience and your trust for the rest of my life. Furthermore, I would like to thank Monash University, for their support and valuable assistance on the development of this thesis and in my professional path. I acknowledge how this experience changed my life.*

Agradeço a UFMG e a PPGQ que ofereceram oportunidade de aprendizado por sua infraestrutura, profissionais e colegas. Agradeço a cada um dos profissionais que direta e indiretamente contribuíram a essa pesquisa. Ao corpo docente que foi fundamental no aprendizado de temáticas importantes para minha carreira acadêmica e que estão presentes nessa tese. Em especial aos porteiros, faxineiras, pessoal da secretaria, técnicos e pessoal da manutenção saibam que essa tese conta diretamente com a contribuição dos seus trabalhos.

E o que seria dessa tese sem o suporte de amigos. Agradeço aos amigos formados ao longo da vida: Frâncis, Dário e Gabriel. Aos amigos formados durante a graduação: Deyse, Kelly, Ana e Jacque. Aos amigos da Hungria: Clio, Yasmin e Vinicius. Aos amigos da pós: Selma e Cláudia (minhas Thelma & Louise), Luciana e Lucas Raposo. Aos amigos da Austrália que levarei comigo para a vida: Glenda (a Julieta do meu bolo de rolo), Priscila, Nina, Danilo, Lucas, Jimmy, Natalia, Sebastian e Guilherme. Todos vocês fazem parte dessa etapa e da pessoa que me tornei.

Aos parceiros dos grupos Lams e Labeer que tiveram grande impacto nessa tese de forma direta e indireta. Além de deixar a jornada mais leve, foram nomes que

estiveram presentes e serão sempre importantes: Ana, Denise, Matheus, Mariana, Daphne, Keila, Jaime, Tarlene, Milena, Odilon, Marina, Julia, Victoria, Stephanie, Flávia, Gabi e Yessica.

Aos colegas do Marriott *group* que engrandeceram meus conhecimentos na área cromatográfica e fizeram minha vivência em Melbourne leve e de grande proveito: *Thank you Yada, Michelle, Neil, Riley, Ian, Annabelle and Yuesong, I'll be always grateful for the learning experience and friendship.*

Ao CNPq, CAPES, FAPEMIG e INCTAA pelo fomento da pesquisa.

“Busquem conhecimento”

Bilu, E.T.

Resumo

O estudo de cervejas e suas matérias primas é de extrema importância para o desenvolvimento científico, tecnológico e comercial desta bebida. Assim, esta tese aborda três trabalhos neste aspecto. O primeiro trabalho desta tese contou com a análise de doze parâmetros em cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de ingestão diária recomendada (IDR) com sais de molibdênio, selênio e cromo. Dentre os resultados encontrados, houve aumento na produção de etanol pela suplementação com os micronutrientes, ocorrendo maior consumo de carboidratos em presença de cromo e uma influência geral na acidez volátil das amostras. Houve diferenças físico-químicas nas cervejas estudadas demonstradas as influências a partir do uso de ferramentas quimiométricas (análise de componentes principais - PCA e análise hierárquica de *clusters* - HCA), assim como diferentes tipos de correlações com estes sais. Por essas ferramentas foi possível verificar a maior similaridade entre amostras controle e com suplementação de molibdênio, assim como relação de dicetonas vicinais e cor para a suplementação de cromo. Já para o segundo trabalho, foram estudados os comportamentos de voláteis a partir da adição de micronutrientes comerciais de selênio e cromo no mosto cervejeiro durante a produção de quatro tipos de cerveja (Au, AuH, IPA e St). Os voláteis foram determinados via microextração de fase sólida por *headspace* (HS-SPME) e cromatografia bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas (GC×GC-MS). A análise multimodo de componentes principais (MPCA) foi usada a fim de explorar possíveis alterações a partir da adição de micronutrientes, sendo verificada a alteração principalmente com a adição de cromo e influência nos álcoois presentes nas amostras. Além disso, os modelos individuais para cervejas Au e AuH demonstram novamente diferenças no perfil de voláteis pela MPCA, assim como diferenças para selênio com compostos como ácido octanóico. O terceiro trabalho contou com a análise de metabólitos em lúpulo por HS-SPME-GC×GC-MS. A melhor condição de extração por SPME nas condições estudadas ocorreu com o uso de fibra DVB/PDMS (65 µm), 500 mg de lúpulo moído e tempo de extração 40 minutos a 50 °C. Cinco variedades de lúpulo foram estudadas por análise global: Azzaca, Cascade, Enigma, Loral e Zappa. Comparando-se GC-MS e GC×GC-MS, houve uma melhoria na detecção de picos com um aumento de até 316,8%. Assim, foram tentativamente identificados 137 compostos de 10 classes diferentes, com valores entre 87,6% e 96,9% da área total de pico nas amostras das áreas cromatográficas. A partir de PCA para os compostos identificados, PCA e HCA para as classes de compostos, houve similaridades entre Zappa e Cascade, e Azacca e Loral. Com estes trabalhos, conclui-se que a suplementação de micronutrientes assim como o uso de HS-SPME-GC×GC para análise de lúpulos agregam boas perspectivas para a tecnologia cervejeira.

Palavras-chave: Micronutrientes; estimulação química; GC×GC; SPME; *Humulus lupulus*

Abstract

The study of beers and their raw materials is of utmost importance for the scientific, technological, and commercial development of this beverage. Thus, this thesis addresses three works in this aspect. The first work of this thesis involved the analysis of twelve parameters in blond ale beers with the addition of 7.5%, 12.5%, and 17.5% of the recommended daily intake value (IDR) with molybdenum, selenium, and chromium salts. Among the results found, there was an increase in ethanol production due to the supplementation with micronutrients, leading to higher carbohydrate consumption in the presence of chromium and a general influence on the volatile acidity of the samples. There were physicochemical differences in the studied beers demonstrated by the influences from the use of chemometric tools (principal component analysis - PCA and hierarchical cluster analysis - HCA), as well as different types of correlations with these salts. Through these tools, it was possible to verify the greatest similarity between control samples and those with molybdenum supplementation, as well as the relationship of vicinal diketones and color for chromium supplementation. As for the second work, the volatile behaviors were studied by adding commercial selenium and chromium micronutrients to the brewing wort during the production of four types of beer (Au, AuH, IPA, and St). Volatiles were determined via solid-phase microextraction by headspace (HS-SPME) and comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC×GC-MS). Multimodal principal component analysis (MPCA) was used to explore possible alterations due to the addition of micronutrients, with alterations mainly observed with chromium addition and influence on the alcohols present in the samples. In addition, individual models for Au and AuH beers again demonstrate differences in the volatile profile by MPCA, as well as differences for selenium with compounds like octanoic acid. The third work involved the analysis of hop metabolites by HS-SPME-GC×GC-MS. The best SPME extraction condition under the studied conditions occurred with the use of DVB/PDMS fiber (65 µm), 500 mg of ground hops, and extraction time of 40 minutes at 50 °C. Five hop varieties were studied globally: Azzaca, Cascade, Enigma, Loral, and Zappa. Comparing GC-MS and GC×GC-MS, there was an improvement in peak detection with an increase of up to 316.8%. Thus, 137 compounds of 10 different classes were tentatively identified, with values between 87.6% and 96.9% of the total peak area in the chromatographic areas. Through PCA for the identified compounds, PCA and HCA for the classes of compounds, similarities were found between Zappa and Cascade, and Azacca and Loral. With these works, it is concluded that the supplementation of micronutrients as well as the use of HS-SPME-GC×GC for hop analysis add good prospects for brewing technology.

KeyWords: Micronutrients; chemical stimulation; GC×GC; SPME; *Humulus lupulus*

Lista de figuras

Figura 2.1: Perfil de consumo e produção de cervejas, em bilhões de litros, no ano de 2018 nos dez principais países consumidores de cerveja no mundo.	27
Figura 2.2: Processo da conversão de cevada em malte.	29
Figura 2.3: Esquema do processo de produção de cerveja.	35
Figura 2.4: Metabolismo simplificado da levedura com a visão geral de produção de alguns de seus metabólitos. TCA - Ciclo do ácido tricarboxílico, HCAs - ácidos hidroxicinâmicos.	36
Figura 2.5: Esquema representativo da formação de moléculas cruciais durante as etapas de fermentação e respiração.	38
Figura 2.6: Consumo de carboidratos pelas leveduras em processo de fermentação de mosto cervejeiro.	39
Figura 2.7: Rotas metabólicas de formação e conversão de <i>off flavours</i> diacetil e 2,3-pentanodiona em compostos de melhor percepção sensorial: pentano-2,3-diol, butano-2,3 diol e acetoína.	42
Figura 2.8: Sistema de cromatografia a gás (GC) com representação do sistema cromatográfico, separação pela coluna capilar e aquisição de dados.	45
Figura 2.9: Sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) com representação do sistema cromatográfico, separação pela coluna capilar, componentes do modulador de estado sólido (SSM) e aquisição de dados.	49
Figura 2.10: Amostrador de SPME com a descrição de seus componentes em disposição da fibra recolhida e fibra exposta e representação dos polímeros na forma dos seus monômeros aplicados no recobrimento de fibras.	51
Figura 2.11: Esquema de equilíbrio entre amostra, <i>headspace</i> e fibra de SPME a partir das etapas de aquecimento e equilíbrio, exposição da fibra e sorção de compostos.	52
Figura 2.12: Perdas de Se durante o processo de fabricação de cerveja em 250 g de amostra de grão de trigo.	67
Figura 3.1: Sistema de fermentação aplicado nas matrizes estudadas.	78
Figura 3.2: Equação química da reação fenol-sulfúrico empregada para determinação de carboidratos totais.	80
Figura 3.3: Equação química da reação para determinação de Amino Nitrogênio livre pelo uso de ninidrina.	83
Figura 3.4: Perfil cinético de consumo de carboidratos totais em cervejas <i>blond ale</i> (n=3 e desvio padrão) com extrato de malte líquido e em presença do micronutriente selênio 41,25 µg L ⁻¹	86
Figura 3.5: Perfil cinético de produção de etanol em cervejas <i>blond ale</i> (n=3) com extrato de malte líquido e em presença de micronutriente selênio 41,25 µg L ⁻¹	86
Figura 3.6: Mudança de pH em cervejas <i>blond ale</i> com extrato de malte líquido e em presença de micronutriente selênio 41,25 µg L ⁻¹ durante o processo fermentativo.	87

Figura 3.7: Mudança de acidez total (mEq L^{-1}) em cervejas <i>blond ale</i> com extrato de malte líquido e em presença de micronutriente selênio $41,25 \mu\text{g L}^{-1}$ durante o processo fermentativo.	88
Figura 3.8: Cor e amargor no mosto e em cervejas <i>blond ale</i> ($n=3$) com extrato de malte líquido e em presença de micronutriente selênio $41,25 \mu\text{g L}^{-1}$	89
Figura 3.9: Escala de cores SRM e EBC em cervejas, e exemplos de sua coloração em amostras reais.	89
Figura 3.10: Perfil de FAN em cervejas <i>blond ale</i> ($n=3$) com extrato de malte líquido e em presença de micronutriente selênio $41,25 \mu\text{g L}^{-1}$ durante o processo fermentativo.	90
Figura 3.11: Cor, amargor, pH e densidade ótica em cervejas <i>blond ale</i> com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	92
Figura 3.12: Concentração de etanol (a) e carboidratos totais (b) em cervejas <i>blond ale</i> ($n=3$) com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	94
Figura 3.13: Acidez total, fixa e volátil em cervejas <i>blond ale</i> ($n=3$) com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	96
Figura 3.14: Dicetonas vicinais (a) e amino nitrogênio livre (b) em cervejas <i>blond ale</i> ($n=3$) com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	97
Figura 3.15: Matriz de correlação de Pearson para a cerveja com presença de Selênio, Cromo e molibdênio.	100
Figura 3.16: Modelo de PCA entre primeira e segunda componentes aplicado em características físico-químicas de cervejas <i>blond ale</i> com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	101
Figura 3.17: Gráfico de pesos de PC1xPC2 aplicado em características físico-químicas de cervejas <i>blond ale</i> com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	102
Figura 3.18: Dendograma de HCA aplicado em características físico-químicas de cervejas <i>blond ale</i> com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	103
Figura 4.1: Demonstração gráfica do modelo MPCA com a representação da decomposição de uma matriz tridimensional (X) no somatório do produto entre vetores de escores (t) e matrizes de peso (P), além do tensor E contendo os erros do modelo.	107
Figura 4.2: Níveis de suplementação de micronutrientes de cromo e selênio na fermentação de cervejas <i>Canadian Indian Pale Ale</i> (IPA), Stout, <i>Australian Pale Ale</i> com e sem adição do lúpulo Enigma.	109
Figura 4.3: Cromatogramas obtidos por HS-SPME-GC×GC-MS para as amostras de (A) lúpulo do tipo Enigma, (B) mosto produzido pelo kit de produção cervejeira e (C) o mesmo mosto com adição de lúpulo Enigma em sua composição.	112
Figura 4.4: Diagrama de Venn para o número de compostos voláteis identificados por HS-SPME-GC×GC-MS em amostras de lúpulo enigma, mostos produzidos a partir do kit de produção cervejeira (Au) e com adição de lúpulo (AuH) assim como a cerveja final.	114
Figura 4.5: Cromatogramas de cerveja controle AuH por HS-SPME-GC×GC-MS com (A) sua projeção no modo 3D e (B) 2D.	115

Figura 4.6: Gráficos de escores em MPCA entre (A) PC1xPC2 e (B) PC2xPC3 para amostras de cerveja dos tipos Stout (St), Canadian Indian Pale Ale (IPA), Australian Pale Ale (Au) e Australian Pale Ale com uso do lúpulo Enigma (AuH) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.	118
Figura 4.7: Gráficos de pesos em MPCA entre (A) PC1 e (B) PC3 para amostras de cerveja dos tipos Stout (St), Canadian Indian Pale Ale (IPA), Australian Pale Ale (Au) e Australian Pale Ale com uso do lúpulo Enigma (AuH) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.	119
Figura 4.8: Gráficos de escores em MPCA entre (A) PC1xPC2 e (B) PC3xPC4 para amostras de cerveja do tipo Australian Pale Ale (Au) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.	121
Figura 4.9: Gráficos de pesos em MPCA para PC2 e PC3 em amostras de cerveja do tipo Australian Pale Ale (Au) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.	121
Figura 4.10: Gráficos de escores em MPCA entre PC1xPC3 para amostras de cerveja do tipo Australian Pale Ale com adição de lúpulo Enigma (AuH) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.	122
Figura 4.11: Gráficos de pesos em MPCA para PC3 em amostras de cerveja do tipo Australian Pale Ale com adição de lúpulo Enigma (AuH) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.	123
Figura 5.1: Organograma para análise dos lúpulos por HS-SPME-GC×GC-MS.....	130
Figura 5.2: Comparação entre dois cromatogramas de GC-MS (A) e GC×GC-MS (B) aplicando HS-SPME em lúpulo Cascade, onde o GC-MS e a ¹ D coluna de GC×GC-MS foram configuradas com coluna DB-5ms UI (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm <i>d_f</i>) e a ² D coluna uma SUPELCOWAX 10 (1,0 m × 0,10 mm D.I. × 0,10 µm <i>d_f</i>), e a estrutura dos compostos selecionados (C) representada por a-g expressos em (A) e (B).	133
Figura 5.3: Cromatogramas de 4 tipos de fibras de SPME, pela sua cor em lúpulo Cascade por HS-SPME-GC×GC-MS.	135
Figura 5.4: Gráficos de equilíbrio de extração de voláteis em lúpulo Cascade por HS-SPME-GC×GC-MS com massa de lúpulo (eixo x) versus área de cada analito corrigida pelo padrão interno (IS) para compostos representativos das 7 classes presentes em lúpulos (n=3).	137
Figura 5.5: Gráficos de Pareto de voláteis em lúpulo Cascade por HS-SPME-GC×GC-MS com efeito estimado padronizado (Valor absoluto) para compostos representativos das 7 classes presentes em lúpulos.	139
Figura 5.6: Superfícies de resposta para o planejamento BBD com os 2 fatores mais significativos pelo gráfico de Pareto para os compostos Isobutanoato de isoamila, Mirceno, Linalol, Cariofileno, Epóxido de humuleno II e 2-Undecanona em amostra de lúpulo Cascade.	140
Figura 5.7: Diagrama de ápices dos compostos presentes nas amostras de lúpulo AZAC, CASC, ENIG, LORA e ZAPP por classes (A) e com a separação de terpenos (B).	150

Figura 5.8: Composição das amostras de lúpulo AZAC, CASC, ENIG, LORA e ZAPP com base nas classes de compostos expressas em porcentagem (%)	151
Figura 5.9: Gráfico Biplot para a análise de componentes principais (PCA), representando (A) PC1xPC2 e (B)PC1xPC3 com descrição do tipo de lúpulo em negrito e a numeração representando os compostos identificados.	152
Figura 5.10: Análise estatística multivariada de PCA expressa pelo gráfico de biplot de PC1xPC2 (A), PC1xPC3 (B) e o HCA (C) para os lúpulos AZAC, CASC, ENIG, LORA e ZAPP em relação às classes de compostos.	155
Anexos e apêndices	
Figura A.1: Processo de conversão de amido em açúcares fermentescíveis.....	175
Figura A.2: Perfil cinético de fermentação a partir dos componentes substrato (S), inóculo (X) e produto (P).....	178
Figura A.3: Processo cinético de fermentação com base no crescimento de microrganismos (X) expresso pelo logaritmo no número de células, onde os estágios são apresentados como fases (1) “lag”, (2) de transição, (3) exponencial ou “log”, (4) de desaceleração, (5) estacionária e (6) declínio ou morte.	179
Figura A.4: Processo de reprodução da levedura a partir do processo de brotamento ou <i>Budding</i>	180
Figura A.5: Gráfico variância explicada versus número de componente principal aplicado em características físico-químicas de cervejas <i>blond ale</i> com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	188
Figura A.6: Gráfico de hotelling T ² versus Q residuais do modelo PCA aplicado em características físico-químicas de cervejas <i>blond ale</i> com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	189
Figura A.7: Gráfico <i>biplot</i> de PC1xPC2 aplicado em características físico-químicas de cervejas <i>blond ale</i> com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	189
Figura A.8: Modelo de PCA entre PC1 e PC3 aplicado em características físico-químicas de cervejas <i>blond ale</i> com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	190
Figura A.9: Gráfico <i>loadings</i> de PC1xPC3 aplicado em características físico-químicas de cervejas <i>blond ale</i> com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	190
Figura A.10: Modelo de PCA entre PC1 e PC4 aplicado em características físico-químicas de cervejas <i>blond ale</i> com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	191
Figura A.11: Gráfico <i>loadings</i> de PC1xPC4 aplicado em características físico-químicas de cervejas <i>blond ale</i> com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.	191
Figura A.12: Cromatograma de GC×GC–MS por HS–SPME para a série de alcanos (C8-C15).....	192
Figura A.13: Cromatograma de GC×GC–MS por HS–SPME para a série de alcanos (C16-C21).....	192
Figura A.14: Gráfico de número de componentes principais por variância capturada para o modelo de MPCA para testes exploratórios da influência de adição de micronutrientes de Cr e Se em cervejas Au, AuH, IPA e St.	199

Figura A.15: Gráfico da primeira rodada de remoção de <i>outliers</i> para o modelo de MPCA para testes exploratórios da influência de adição de micronutrientes de Cr e Se em cervejas Au, AuH, IPA e St.	199
Figura A.16: Gráfico da segunda rodada de remoção de <i>outliers</i> para o modelo de MPCA para testes exploratórios da influência de adição de micronutrientes de Cr e Se em cervejas Au, AuH, IPA e St.	200
Figura A.17: Gráfico da rodada final de remoção de <i>outliers</i> para o modelo de MPCA para testes exploratórios da influência de adição de micronutrientes de Cr e Se em cervejas Au, AuH, IPA e St.	200
Figura A.18: Gráfico de escores em MPCA entre PC4 e número de amostras para amostras de cerveja dos tipos Stout (St), Canadian Indian Pale Ale (IPA), Australian Pale Ale (Au) e Australian Pale Ale com uso do lúpulo Enigma (AuH) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.	201
Figura A.19: Gráfico de escores em MPCA entre PC5 e número de amostras para amostras de cerveja dos tipos Stout (St), Canadian Indian Pale Ale (IPA), Australian Pale Ale (Au) e Australian Pale Ale com uso do lúpulo Enigma (AuH) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.	201
Figura A.20: Espectro de massas para o pico presente em ^1t_R 43,18 min e ^2t_R 3,23 s, com relevância descrita pela matriz de pesos em PC3 em modelo de MPCA com todas as cervejas estudadas e de 2-metil-1-undecanol.....	202
Figura A.21: Comparação entre duas configurações de coluna para GC×GC aplicando HS-SPME para o lúpulo do tipo Cascade, onde para a coluna ^1D é uma DB-5ms UI (30 m × 0,25 mm I.D. × 0,25 µm d_f) e as colunas ^2D : (A) BPX50(1,0 m × 0,10 mm I.D. × 0,10 µm d_f) e (B) SUPELCOWAX10 (1,0 m × 0,10 mm I.D. × 0,10 µm d_f)	204
Figura A. 22: Definição do período de modulação para a separação dos compostos presentes em lúpulo Cascade por HS-SPME-GC×GC-MS com colunas na ^1D : DB-5MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e ^2D : BPX50(1,0 m x 0,15 mm x 0,15 µm) para os tempos de 4, 5, 6 e 7 s.	205
Figura A.23: Cromatograma de GC×GC–MS por HS–SPME para a série de alcanos (C8-C15).....	206
Figura A.24: Cromatograma de GC×GC–MS por HS–SPME para a série de alcanos (C16-C21).....	206
Figura A.25: Comparação entre dois cromatogramas de GC–MS (A) e GC×GC–MS (B) aplicando HS-SPME em lúpulo Enigma, onde o GC–MS e a ^1D coluna de GC×GC–MS foram configuradas com coluna DB-5ms UI (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm d_f) e a ^2D coluna uma SUPELCOWAX 10 (1,0 m × 0,10 mm D.I. × 0,10 µm d_f), e a estrutura dos compostos selecionados (C) representada por a-g expressos em (A) e (B).	207
Figura A.26: Comparação entre dois cromatogramas de GC–MS (A) e GC×GC–MS (B) aplicando HS-SPME em lúpulo Zappa, onde o GC–MS e a ^1D coluna de GC×GC–MS foram configuradas com coluna DB-5ms UI (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm d_f) e a ^2D coluna uma SUPELCOWAX 10 (1,0 m × 0,10 mm D.I. × 0,10 µm d_f), e a estrutura dos compostos selecionados (C) representada por a-g expressos em (A) e (B).	208
Figura A.27: GC×GC-MS cromatograma por HS-SPME do lúpulo Azacca (AZAC)	209
Figura A.28: GC×GC-MS cromatograma por HS-SPME do lúpulo Loral (LORA).....	209

Lista de tabelas

Tabela 2.1: Estrutura e composição de alfa-ácidos e beta-ácidos presentes no lúpulo.....	31
Tabela 2.2: Composição físico-química e sua influência na água cervejeira.	32
Tabela 2.3: Ordem da captação de aminoácidos durante o processo de fermentação.....	39
Tabela 2.4: Algumas das fibras comerciais presentes no mercado, com especificação do tipo de fibra, espessura, uso, mecanismo de extração e faixa de massa molar (g mol^{-1}).	53
Tabela 2.5: Alguns compostos orgânicos voláteis (VOCs) associados aos aromas da cerveja.....	56
Tabela 2.6: Alguns métodos de detecção de VOCs em diferentes tipos de cervejas, técnicas instrumentais e procedimento de preparo de amostra	57
Tabela 2.7: Revisão de estudos aplicados a análise de lúpulos por GC×GC	59
Tabela 2.8: Minerais inorgânicos e seu efeito em cerveja como macro e micronutrientes.	63
Tabela 2.9: Técnicas analíticas empregadas na determinação da concentração de selênio em amostras de cerveja.	65
Tabela 2.10: Concentração de molibdênio em matérias primas de cerveja.	69
Tabela 2.11: Técnicas analíticas empregadas na determinação da concentração de cromo em amostras de cerveja.....	71
Tabela 3.1: Níveis de concentração de micronutrientes e nível de IDR aplicado no planejamento de fermentação.	77
Tabela 3.2: Valores de IDR e limites máximos para cada micronutriente conforme as legislações vigentes no Brasil e a respectiva identificação do composto (CAS).....	90
Tabela 3.3: Volume máximo de consumo diário das cervejas suplementadas baseado nos limites máximos de adição dos nutrientes conforme legislação brasileira.	91
Tabela 3.6: Extrato real, extrato aparente, grau aparente de fermentação e grau real de fermentação em cervejas <i>blond ale</i> com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.....	95
Tabela 4.1: Identificação de compostos reportados no gráfico de pesos em PC3 para o modelo MPCA com todas as amostras de cerveja.....	120
Tabela 5.1: Planejamento de experimentos BBD para otimização de extração de compostos em lúpulo cascade a partir de HS-SPME-GC×GC–MS.....	129
Tabela 5.2: Estudo comparativo dos tipos de fibras de SPME, pela sua cor e determinação dos compostos em lúpulo Cascade por HS-SPME-GC–MS.	134
Tabela 5.3: Informações sobre os planejamentos BBD para 7 compostos de diferentes classes em lúpulo Cascade com a descrição dos RI reportados na literatura e experimentalmente, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor da falta de ajuste determinados por ANOVA.	138

Tabela 5.4: Comparação de picos de 3 amostras de lúpulo (CASC, ENIG e ZAPP) por GC–MS e GC×GC–MS.....	142
Tabela 5.5: Informação da composição do perfil de lúpulo usando HS–SPME–GC×GC–MS	143
Tabela 5.6: Compostos encontrados exclusivamente em apenas uma das amostras de lúpulo.....	149

Anexos e Apêndices

Tabela A.1: Enzimas de interesse durante a produção de cervejas e perfil indicado de temperatura e pH para sua eficiência.	176
Tabela A.2: Tratamento estatístico para o conjunto de dados etanol para o micronutriente de selênio.....	182
Tabela A.3: Tratamento estatístico para o conjunto de dados etanol para o micronutriente de molibdênio.....	182
Tabela A.4: Tratamento estatístico para o conjunto de dados etanol para o micronutriente de cromo.	182
Tabela A.5: Tratamento estatístico para o conjunto de dados carboidratos totais para o micronutriente de selênio.....	183
Tabela A.6: Tratamento estatístico para o conjunto de dados carboidratos totais para o micronutriente de molibdênio.....	183
Tabela A.7: Tratamento estatístico para o conjunto de dados carboidratos totais para o micronutriente de cromo.	183
Tabela A.8: Tratamento estatístico para o conjunto de dados acidez total para o micronutriente de selênio.....	184
Tabela A.9: Tratamento estatístico para o conjunto de dados acidez total para o micronutriente de molibdênio.....	184
Tabela A.10: Tratamento estatístico para o conjunto de dados acidez total para o micronutriente de cromo.	184
Tabela A.11: Tratamento estatístico para o conjunto de dados acidez fixa para o micronutriente de selênio.....	185
Tabela A.12: Tratamento estatístico para o conjunto de dados acidez fixa para o micronutriente de molibdênio.....	185
Tabela A.13: Tratamento estatístico para o conjunto de dados acidez fixa para o micronutriente de cromo.	185
Tabela A.14: Tratamento estatístico para o conjunto de dados VDK para o micronutriente de selênio.....	186
Tabela A.15: Tratamento estatístico para o conjunto de dados VDK para o micronutriente de molibdênio.....	186
Tabela A.16: Tratamento estatístico para o conjunto de dados VDK para o micronutriente de cromo.	186
Tabela A.17: Tratamento estatístico para o conjunto de dados FAN para o micronutriente de selênio.....	187
Tabela A.18: Tratamento estatístico para o conjunto de dados FAN para o micronutriente de molibdênio.....	187

Tabela A.19: Tratamento estatístico para o conjunto de dados FAN para o micronutriente de cromo.	187
Tabela A.20: Percentual de variância explicada pela PCA.	188
Tabela A.21: Compostos tentativamente identificados por HS-SPME-GC×GC-MS para mostos e amostras de cervejas controle do tipo Australian Pale Ale com (Au) e sem (AuH) a adição de lúpulo enigma (ENIG).....	193
Tabela A.22: Informações dos lúpulos	203
Tabela A.23: Precisão intradiária e interdiária de picos selecionados por HS-SPME-GC×GC –MS em lúpulo.	203
Tabela A.24: Série de n-alcanos C8-C21 e seus respectivos tempos de retenção na primeira dimensão (¹ t _R – DB-5msUI) e segunda dimensão (² t _R – SUPELCOWAX 10).	204
Tabela A.25: Informação sobre a composição de lúpulos por HS-SPME-GC–MS	210
Tabela A.26: Características da água aplicada nas receitas de fermentação.....	213

Lista de abreviaturas e siglas

μ	Velocidade específica de crescimento	ASBC	Sociedade americana de químicos cervejeiros (<i>American Society of Brewing Chemists</i>)
¹D	Primeira dimensão	ATP	Adenosina Trifosfato
²D	Segunda dimensão		
³D	Terceira dimensão		
1DGC	Cromatografia a gás unidimensional	BBD	Planejamento Box-Behnken
2GC×2GC	Cromatografia gasosa bidimensional abrangente paralela		
¹t_R	Tempo de retenção na ¹ D		
²t_R	Tempo de retenção na ² D		
4MMP	4-mercapto-4-metilpentan-2-ona	CAR	Carboxeno
4MSP	4-metil-4-sulfanilpentan-2-ona	CV	Coefficiente de variação
		Cet	Cetona
		C_x	Concentração do analito em x
A		B	
AAS	Espectroscopia de absorção atômica (<i>Atomic Absorption Spectroscopy</i>)		
ABV	Álcool por volume (<i>Alcohol by Volume</i>)		
accTOF	Tempo de voo de alta precisão		
ADF	Grau de fermentação aparente (<i>Apparent Degree of Fermentation</i>)		
ADP	Adenosina Difosfato		
AE	Extrato aparente		
AGREE	Métrica analítica GREenEss (<i>Analytical GREenEss Metric</i>)		
Alc	Álcool		
Ald	Aldeído		
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária		
			C
			D
		d_f	Espessura do filme
		DEG	Dietilenoglicol
		DFS	Sílica fundida desativada (<i>Deactivated Fused Silica</i>)
		DHS	Headspace dinâmico (<i>Dinamic Headspace</i>)
		D.I.	Diâmetro interno
		DP	Desvio padrão
		DRC	Célula de reação dinâmica (<i>Dynamic Reaction Cell</i>)
		DVB	Divinilbenzeno
			E
		EBC	Convenção europeia de cervejeiros (<i>European Brewery Convention</i>)

ECD Detector de captura de elétrons
(*Electron Capture Detector*)

EG Etilenoglicol

Est Éster

F

FAO Organização das Nações Unidas
para a alimentação e a agricultura
(*Food and Agriculture Organization
of the United States*)

FAN Amino nitrogênio livre (*Free Amino
Nitrogen*)

FID Detector por ionização de chamas
(*Flame Ion Detector*)

FPD Detector fotométrico de chama
(*Flame Photometric Detector*)

FTIR Infravermelho com transformada
de Fourier (*Fourier Transform
Infrared*)

G

GAPI Índices de procedimento de
química verde (*Green Analytical
Procedure Index*)

GC Cromatografia a gás (*Gas
Chromatography*)

GC×GC Cromatografia a gás bidimensional
abrangente

GF Forno de grafite

H

H/C *Heart-cut*

HCA Análise hierárquica de *clusters*
(*Hierarchical Cluster Analysis*)

HCAs Ácidos hidroxicinâmicos
(*HydroxyCinnamic Acids*)

Hid Hidrocarboneto

HidM Hidrocarboneto monoterpênico

HidS Hidrocarboneto sesquiterpênico

HPLC Cromatografia líquida de alta
eficiência (*High Performance
Liquid Chromatography*)

HRMS Espectrômetro de massas de alta
resolução (*High Resolution Mass
Spectrometry*)

HS *Headspace*

I

I Índice de retenção

IBU Unidade internacional de amargor
(*International Bitterness Units*)

ICP Plasma indutivamente acoplado
(*Inductively Coupled Plasma*)

IDR Ingestão Diária Recomendada

IS Padrão interno (*Internal Standard*)

K

K_x Coeficiente de distribuição das
fases

L

LLE Extração líquido-líquido
(*Liquid-Liquid Extraction*)

LMCS Sistema criogênico modulado
longitudinalmente (*Longitudinally
Modulated Cryogenic System*)

LQ Limite de quantificação

M

mSBSE Múltipla extração sortiva com barra
de agitação (*Multiple Stir-Bar
Sorptive Extraction*)

MAPA Ministério da Agricultura, Pecuária
e Abastecimento

MDGC Cromatografia gasosa
multidimensional (*Multidimensional
Gas Chromatography*)

MM Massa Molar

MO	Monoterpeno oxigenado
MPCA	Análise multimodo de componentes principais (<i>Multiway Principal Component Analysis</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MSR	Metodologia de superfície de respostas

N

NAD	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
Nident	Não Identificado
NIR	Infravermelho próximo (<i>Near Infrared</i>)

O

O	Olfatometria
OD	Densidade ótica (<i>Optical Density</i>)
OE	Extrato original ou primitivo
OG	Gravidade original (<i>Original Gravity</i>)
Out	Outros

P

P	Produto
P_i	Fosfato inorgânico
PA	Poliacrilato
PARAFAC	Análise de fatores paralelos (<i>Parallel Factor Analysis</i>)
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis</i>)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Polietilenoglicol
P_M	Período de modulação
ppm	Parte por milhão

Q

QMS	Espectrômetro de massas de quadrupolo
------------	---------------------------------------

R

R²	Coefficiente de determinação
RDC	Resolução da diretoria colegiada
RDF	Grau de fermentação real (<i>Real Degree of Fermentation</i>)
RE	Extrato real
RI	Índice de retenção
rpm	Rotação por minuto

S

S	Substrato
SAFE	evaporação de sabor assistida por solvente (<i>Solvent-Assisted Flavour Extraction</i>)
SBSE	Extração sortiva com barra de agitação (<i>Stir-Bar Sorptive Extraction</i>)
SeMet	Selenometionina
SeCys	Selenocisteína
SHS	<i>Headspace</i> estático (<i>Static Headspace</i>)
S/N	Razão do sinal ruído
SO	Sesquiterpeno oxigenado
SPE	Extração de fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração de fase sólida (<i>Solid Phase Microextraction</i>)
SRM	Método de referência padrão (<i>Standard Reference Method</i>)
SSM	Modulador de estado sólido (<i>Solid State Modulator</i>)

T	
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico (<i>Tricarboxylic Acid Cycle</i>)
TCD	Detector de condutividade térmica (<i>Thermal Conductivity Detector</i>)
TOFMS	Espectrometria de massas com tempo de voo (<i>Time-of-flight Mass Spectrometry</i>)

U	
UV	Ultravioleta

V	
VALLME	Microextração líquido-líquido assistida por vórtex

VDK	Dicetonas vicenais (<i>Vicinal Diketones</i>)
vis	Visível
VOCs	Compostos orgânicos voláteis (<i>Volatile Organic Compounds</i>)
VOMs	Metabólitos orgânicos voláteis (<i>Volatile Organic Metabolites</i>)
V_x	Volume da fase x

X	
X	Inóculo

W	
WHO	Organização mundial da saúde (<i>World Health Organization</i>)

Sumário

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	25
1.1 Objetivos	26
1.1.1 Objetivos gerais	26
1.1.2 Objetivos específicos	26
CAPÍTULO 2. REVISÃO DA LITERATURA	27
2.1 A cerveja	27
2.1.1 Matérias primas	28
2.1.1.1 Malte	28
2.1.1.2 Lúpulo	29
2.1.1.3 Água	31
2.1.1.4 Levedura	32
2.1.1.5 Outros aditivos	33
2.2 Processo de produção	34
2.2.1 Fermentação	35
2.2.1.1 Ciclo metabólico	35
2.2.1.2 Maturação	41
2.2.2 Finalização do produto	42
2.2.3 Qualidade da cerveja	43
2.3 Voláteis	44
2.3.1 Cromatografia a gás (GC) e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC)	44
2.3.2 Microextração de fase sólida (SPME)	50
2.3.3 Voláteis em cerveja	55
2.3.4 Voláteis em lúpulo	58
2.4 Suplementação mineral em cervejas	62
2.4.1 Selênio	64
2.4.2 Molibdênio	68
2.4.3 Cromo	70
CAPÍTULO 3. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DE CERVEJAS ALE COM SUPLEMENTAÇÃO DE CROMO, MOLIBDÊNIO E SELÊNIO	73
3.1 Introdução	73
3.2 Materiais e métodos	74
3.2.1 Materiais e reagentes	74
3.2.2 Produção da Cerveja	75

3.2.3	Planejamento de fermentação.....	76
3.2.3.1	Cerveja <i>Blond ale</i> com malte líquido.....	76
3.2.3.2	Cerveja <i>Blond ale</i> com brassagem do malte.....	77
3.2.4	Caracterização da cerveja.....	78
3.2.4.1	Determinação do pH.....	78
3.2.4.2	Graduação alcoólica.....	78
3.2.4.3	Cor.....	79
3.2.4.4	Amargor.....	79
3.2.4.5	Carboidratos totais.....	80
3.2.4.6	Dicetonas vicinais (VDK).....	81
3.2.4.7	Acidez total.....	81
3.2.4.8	Acidez fixa.....	82
3.2.4.9	Acidez volátil.....	82
3.2.4.10	Leveduras (OD).....	82
3.2.4.11	Amino nitrogênio livre (FAN).....	83
3.2.4.12	Extratos.....	84
3.2.5	Análise estatística dos dados.....	85
3.3	Resultados e discussão.....	85
3.3.1	Testes exploratórios.....	85
3.3.2	Análises físico-químicas nas cervejas suplementadas.....	90
3.3.2.1	Cor, amargor, pH e densidade ótica.....	91
3.3.2.2	Etanol e carboidratos.....	93
3.3.2.3	Extratos.....	94
3.3.2.4	Acidez total, fixa e volátil.....	95
3.3.2.5	VDK e FAN.....	97
3.3.3	Análises estatísticas.....	98
3.4	Conclusões.....	104
CAPÍTULO 4. ESTUDO DO EFEITO DA ADIÇÃO DE SUPLEMENTOS COMERCIAIS DE SELÊNIO E CROMO NA COMPOSIÇÃO DE VOLÁTEIS DE DIFERENTES CERVEJAS POR HS-SPME-GCXGC-MS.....		105
4.1	Introdução.....	105
4.2	Materiais e métodos.....	107
4.2.1	Materiais e reagentes.....	107
4.2.2	Produção da cerveja.....	108
4.2.3	Preparo de amostras.....	109
4.2.4	Condições cromatográficas.....	110
4.2.5	Tratamento de dados.....	111
4.3	Resultados e discussão.....	111

4.3.1	Detecção de voláteis a partir de GC×GC	111
4.3.2	Análises quimiométricas.....	116
4.3.2.1	Modelo quimiométrico contendo todas as amostras de cervejas.....	117
4.3.2.2	Australian Pale Ale (Au).....	120
4.3.2.3	Australian Pale Ale com Lúpulo (AuH)	122
4.4	Conclusões	123
CAPÍTULO 5. DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO PARA A ANÁLISE DE LÚPULOS E SEUS METABÓLITOS A PARTIR DE HS-SPME-GCXGC-MS.....		124
5.1	Introdução.....	124
5.2	Materiais e métodos	126
5.2.1	Materiais e reagentes.....	126
5.2.2	Condições cromatográficas	127
5.2.3	Otimização dos experimentos	128
5.2.4	Preparo de amostras.....	130
5.2.5	Análise de dados.....	131
5.3	Resultados e discussão	131
5.3.1	Otimização dos experimentos	134
5.3.2	Determinação do perfil de voláteis em lúpulos	141
5.4	Conclusões	156
CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES GERAIS		157
REFERÊNCIAS		159
APÊNDICES E ANEXOS.....		172
Apêndice A.....		173
A.1. Produção do mosto.....		173
A.1.1.	Moagem	173
A.1.2.	Mosturação.....	173
A.1.3.	Clarificação.....	176
A.1.4.	Fervura	177
A.1.5.	Tratamento do mosto.....	177
A.2. Fermentação		178
A.2.1.	Cinética de fermentação	178
Apêndice B – Informações complementares do Capítulo 3.....		182
Apêndice C – Informações complementares do Capítulo 4.....		192
Apêndice D – Informações complementares do Capítulo 5.....		203
Anexo A - Composição da água utilizada na produção de cerveja do capítulo 3		213

Capítulo 1. Introdução

Ao longo da história, diversos povos com diferentes níveis de avanço tecnológico descobriram como produzir bebidas alcoólicas a partir de fontes de açúcares disponíveis. Mesmo sendo um processo conhecido e dominado por milênios, poucas alterações significativas estão descritas na literatura. Dentre estas bebidas fermentadas encontra-se a cerveja, que por ser a bebida alcoólica mais consumida mundialmente na atualidade, assume um papel importante no desenvolvimento tecnológico e científico das bebidas alcoólicas.

De acordo com a legislação brasileira, cerveja é a bebida alcoólica fermentada obtida das matérias primas malte, água, lúpulo e levedura [1]. Essa é uma definição clássica, estabelecida em diversos relatos da literatura e atualmente, com o desenvolvimento tecnológico do seu processo de produção, outros ingredientes são comumente adicionados, como enzimas e agentes antiespumantes [2,3].

Dentre esses ingredientes, a adição de micronutrientes é um campo pouco estudado. Apesar de haver estudos de como minerais se apresentam nos alimentos e de como eles beneficiam a saúde humana, ainda é necessário estudar como eles afetam o metabolismo das leveduras. Em uma perspectiva de produção, também se buscam novas formas de aperfeiçoar o processo de fabricação da cerveja, principalmente durante a fermentação. A otimização do processo de fermentação pode ocorrer a partir de diferentes formas, desde a mudança dos tipos de matérias primas até a estimulação física ou química [4-6].

Os compostos voláteis presentes em cerveja e no lúpulo são parte essencial das características sensoriais do produto e sua análise é de relevância expressiva para entendimento de sua composição. Desta forma, técnicas de cromatografia a gás (GC) e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) associadas a

espectrometria de massa (MS) são de grande utilidade para análise desses tipos de amostra.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivos gerais

Os objetivos gerais desta tese foram avaliar a influência da estimulação química, por adição de minerais durante o processo de fermentação de cervejas, assim como analisar o perfil de voláteis de cerveja e de lúpulos por GC×GC.

1.1.2 Objetivos específicos

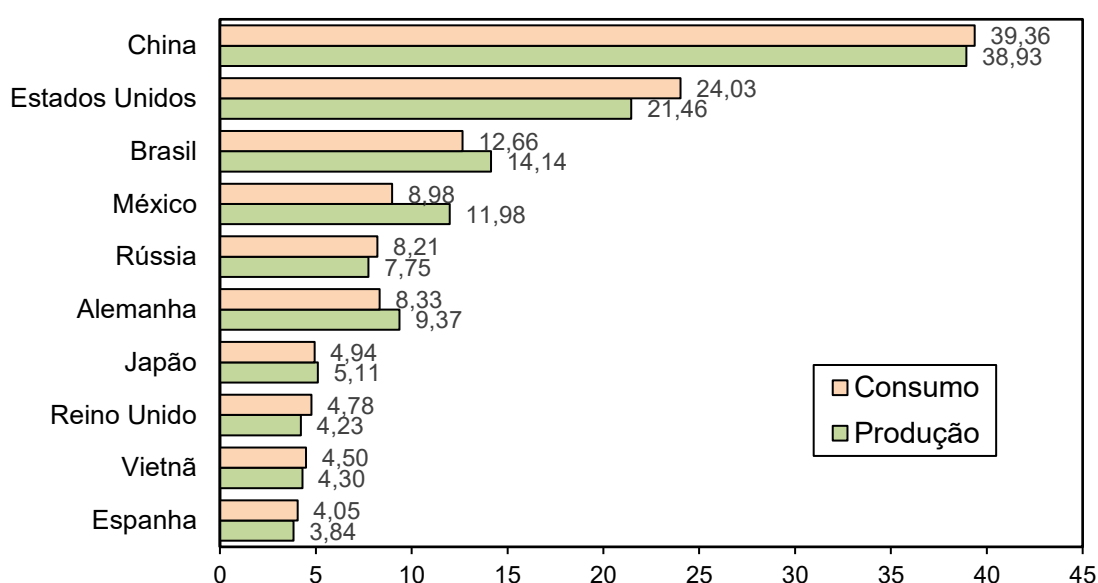
- Produzir cervejas do tipo *ale* contendo Cr (III), Se (IV) e Mo (VI) em diferentes concentrações;
- Avaliar as características físico-químicas finais das cervejas (cor, amargor, pH, acidez, extrato real, aparente e original e teor alcoólico);
- Empregar cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) para análise de compostos orgânicos voláteis (VOC) em cervejas com adição de micronutrientes e lúpulo;
- Aplicar análise multimodo de componentes principais (MPCA) como ferramenta de análise exploratória *multiway* em perfil de voláteis em cervejas por GC×GC;
- Desenvolver, otimizar e aplicar um método cromatográfico de GC×GC–MS para amostras de lúpulo a partir de microextração de fase sólida por *headspace* (HS-SPME);
- Avaliar as diferenças nos perfis de compostos voláteis em lúpulo por meio de ferramentas de estatística multivariada.

Capítulo 2. Revisão da literatura

2.1 A cerveja

Cerveja é um tipo de bebida alcoólica de alta importância e popularidade, sendo ranqueada como a terceira bebida mais consumida mundialmente, perdendo apenas para o café e chá. Dados atuais apontam que cerca de 189 bilhões de litros de cerveja são produzidos anualmente, e o Brasil assume um papel importante no consumo e produção da bebida [7,8]. Como é possível verificar na **Figura 2.1**, ele é o terceiro país que mais consome e produz cervejas no mundo, com participação de 6,7% do consumo e 7,4% da produção mundial [7,8].

Figura 2.1: Perfil de consumo e produção de cervejas, em bilhões de litros, no ano de 2018 nos dez principais países consumidores de cerveja no mundo.



Fonte: Informações de Kirin, 2019 [7] e Kirin, 2020 [8].

Por definição, a cerveja pode ser descrita como uma bebida levemente alcoólica, obtida a partir da fermentação de malte com aromatização pelo lúpulo [9]. Ainda, conforme legislação brasileira, ela é definida como “a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada, por ação da levedura, com adição de lúpulo” [1]. Essas definições são bases que podem ser extrapoladas com uso de diferentes tipos de processamento e matérias primas.

2.1.1 Matérias primas

De forma a entender melhor a composição da cerveja, é de extrema importância conhecer o papel de suas matérias primas. Como dito anteriormente, cervejas são constituídas de malte, lúpulo, água, leveduras e podem possuir adjuntos e outros aditivos. A seguir são explicados os papéis de cada um destes ingredientes.

2.1.1.1 Malte

O malte é o material responsável pela fonte de carbono, que será convertido em metabólitos via fermentação e tem importância para conferir cor, sabor e formação de espuma na bebida. Além desses objetivos, é no malte que se encontram as enzimas que irão atuar nos amidos e proteínas durante o processo de produção da cerveja. O malte é um produto que advém de cereais tais como cevada, trigo, arroz e aveia [10,11].

Sendo um cereal com longa tradição de uso, a cevada é o mais usado na produção de cervejas. Essa tradição é explicada por diversas razões, tais como a facilidade de seu cultivo em diferentes regiões, boa produção de grãos, alta resistividade a doenças, alta concentração de amidos (cerca de 65% da matéria seca do endosperma), riqueza de minerais, vitaminas e ácidos graxos insaturados. Além disso, durante o processo de malteação, ocorre a produção de um número significativo de enzimas [11].

De forma geral, a cevada possui uma composição química favorável para a produção de cerveja. Cerca de 13 a 15% da massa do cereal é composta por água, sendo que a matéria seca é majoritária [10]. A parte seca é composta por carboidratos (70 a 85%), proteínas (9,5 a 12%), matérias inorgânicas (2 a 4%), lipídios (1,5 a 2%) e outras substâncias (1 a 2%) tais como os polifenóis [12]. A riqueza de carboidratos se apresenta com a presença de carboidratos de armazenamento (principalmente

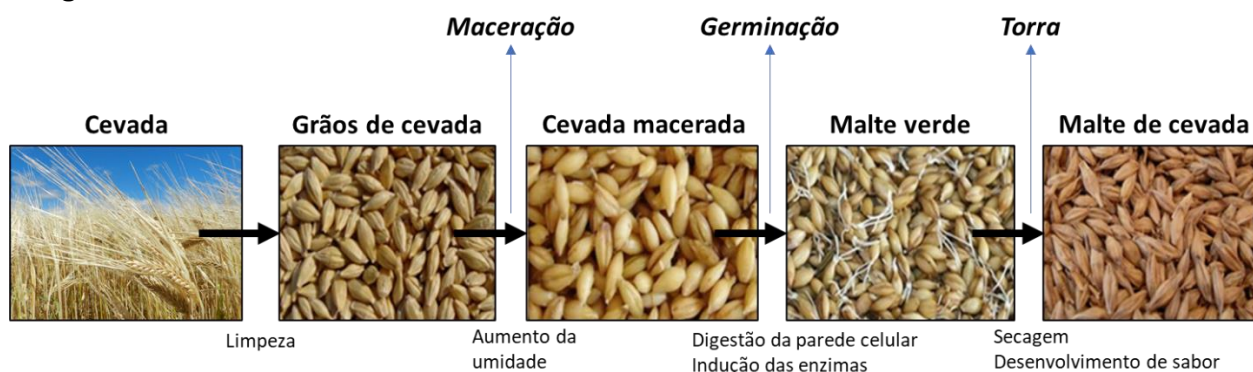
amido) e carboidratos de estrutura (celulose e hemicelulose). O amido é o principal carboidrato nessa composição, apresentando-se como amilose e amilopectina e é encontrado na forma de grãos, ou seja, amiloplastos [11].

Para conversão da cevada em malte é necessário ocorrer o processo de malteação, também conhecido como maltagem. Esse processo (**Figura 2.2**) consiste em etapas de limpeza, maceração, germinação e pela etapa de secagem e torra [10]. A limpeza ocorre de modo a remover impurezas dos cereais para posterior maceração. A maceração é um processo que tem por princípio a modificação da estrutura do cereal a partir da adição de água em condições ideais, como controle de temperatura, aeração e troca de água.

Após isso, a aplicação de umidade irá quebrar a dormência do grão e proporcionar condições adequadas para a germinação. Esta etapa permite o crescimento de radículas provenientes do núcleo da cevada e junto a isso ocorre a ativação de enzimas contidas no grão, dando origem ao chamado malte verde.

Por fim, é necessário haver a secagem do grão para evitar o crescimento vegetal, e/ou a torra, que permite ao grão, neste estágio já maltado, ter uma melhor estocagem e, a partir do grau de torra, conferir sabor e cor à cerveja [12,13].

Figura 2.2: Processo da conversão de cevada em malte.



Fonte: Adaptado de Carvalho, Gonçalves & Guido, 2016 [13]. Licença 5734770698340

2.1.1.2 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta dioica da família Cannabaceae usualmente empregada na produção de cervejas. Mesmo em pequenas quantidades, sua presença influencia no sabor da cerveja, assim como no amargor, na sensação de boca, na estabilidade da espuma, na precipitação proteica durante a clarificação do mosto, no aumento da vida de prateleira e na presença de antioxidantes fenólicos [12,14]. Por se adaptar bem às regiões frias, cerca de 80% da produção de lúpulo é

proveniente da Alemanha e Estados Unidos. Atualmente são comercializados mais de 100 tipos de lúpulos pelo mundo, que podem ser vendidos na forma de flor, pellet ou extratos [15].

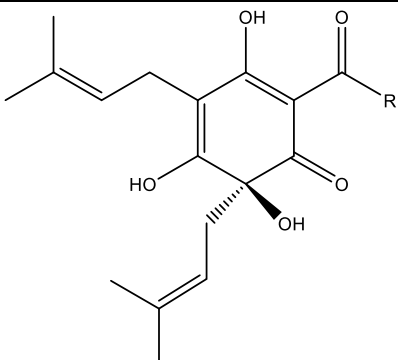
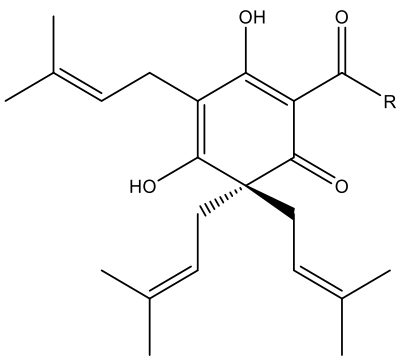
Esta planta é descrita como uma trepadeira perene capaz de produzir flores com alto teor de resinas, polifenóis e óleos essenciais. A flor de lúpulo, também conhecida como cone, é a parte da planta aplicada na produção de cerveja e possui glândulas responsáveis pela secreção do composto de interesse (lupulina), mais especificamente por flores femininas não fertilizadas [14,16,17].

De modo geral, quatro frações do lúpulo são as responsáveis pelo uso de lúpulo em cervejarias, sendo eles: alfa-ácidos, beta-ácidos, óleos essenciais e polifenóis. Os alfa-ácidos são ácidos responsáveis pela sensação de amargor e estabilidade da espuma, representando uma fração mássica de 2 a 20% da composição do lúpulo. Estes ácidos se apresentam na forma de cinco compostos (**Tabela 2.1**) sendo a humulona e a cohumulona os mais importantes. Este sabor amargo característico fornecido pelo lúpulo é definido como amargor, que pode ser medido pela escala de IBU (Unidades Internacionais de Amargor).

O IBU é uma medida que caracteriza a escala de amargor em uma bebida, sendo que 1 IBU equivale a 1 mg de iso-alfa-ácidos por litro de cerveja, e quanto maior o valor, mais amarga será a cerveja. Teoricamente, a escala vai de 0 a 120 IBUs. Este valor máximo é um indicativo de quanto as papilas gustativas conseguem identificar e como este valor pode ser extrapolado [14]. Já os beta-ácidos (**Tabela 2.1**) são uma classe de compostos que geram influência no perfil aromático da cerveja e se apresentam em menor concentração no produto acabado, em detrimento da sua perda durante o processamento da bebida.

Os óleos essenciais são uma fração complexa com relatos de presença de mais de 300 moléculas que influenciam no sabor e aroma da cerveja, a partir das classes de terpenos, terpenoides oxigenados e tióis. Por fim, os polifenóis têm por característica principal a estabilização da cerveja com influência na turbidez e sabor, e podem ser chamados de taninos ou flavonoides [12,16,18].

Tabela 2.1: Estrutura e composição de alfa-ácidos e beta-ácidos presentes no lúpulo.

Alfa-ácidos			
	Nome	R	Composição (%)
	Humulona	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	35 a 70
	Cohumulona	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	20 a 55
	Adhumulona	$\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$	10 a 15
	Prehumulona	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	1 a 10
	Poshumulona	CH_2CH_3	1 a 3
Beta-ácidos			
	Nome	R	Composição (%)
	Lupulona	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	30 a 55
	Colupulona	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	20 a 55
	Adlupulona	$\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$	5 a 10
	Prelupulona	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	1 a 3
	Poslupulona	CH_2CH_3	-

Fonte: Adaptado de Durello, Silva & Bogusz Jr., 2019 [16].

2.1.1.3 Água

Esta matéria prima é a maior constituinte da cerveja, possuindo cerca de 92 a 95% do volume total do produto [15]. Os constituintes químicos presentes na água são intrínsecos da geologia da região em que a cerveja é produzida e por essa razão a localização de cervejarias considera a qualidade da água para sua produção [4,19].

Nem sempre uma água potável é considerada como uma água cervejeira, sendo que a presença de alguns compostos pode influenciar no sabor da cerveja. A presença de sais minerais e matérias orgânicas são características naturais da água e podem também afetar os processos químicos e enzimáticos [19,20]. De forma geral, a **Tabela 2.2** sumariza alguns elementos e compostos, e sua influência na cerveja.

Tabela 2.2: Composição físico-química e sua influência na água cervejeira.

Composto	Influência
Cálcio	Dureza da água, controle de pH, estabilização de alfa-amilases, estimula a coagulação de proteínas e precipitação de íons oxalato. Limites preferenciais de 50 a 200 mg L ⁻¹
Magnésio	Dureza da água, alcalinidade, cofator do piruvato descarboxilase (enzima que atua durante a fermentação pela levedura) e pode afetar o sabor azedo e adstringente. Limites preferenciais de 5 a 40 mg L ⁻¹
Cloreto	Aumenta o sabor da cerveja relacionado às características do malte (0 a 100 mg L ⁻¹)
Sódio	Acentua os sabores doces do malte (<150 mg L ⁻¹) e em altas concentrações afeta negativamente o sabor da cerveja com sabores salgados e azedos (>150 mg L ⁻¹)
Ferro	Causa estabilidade da espuma, pode promover reações de oxirredução e em concentrações maiores que 0,1 mg L ⁻¹ causa sabor adstringente e turbidez amarronzada
Zinco	Estimula a fermentação (de 0,1 a 0,5 mg L ⁻¹) e é tóxico em altas concentrações
Cobre	Reduz o sabor negativo do enxofre (<1 mg L ⁻¹) e é tóxico em altas concentrações (>10 mg L ⁻¹)
Manganês	Cofator em reações enzimáticas (<0,2 mg L ⁻¹) e em altas concentrações (>0,2 mg L ⁻¹) acelera a deterioração da cerveja pela conversão de oxigênio em espécies reativas
Nitrato	Componente indesejado pela sua conversão em nitrito tóxico
Nitrito	Inibe o crescimento de levedura

Fonte: Adaptado de Palmer & Kaminski, 2013 [19].

Como dito, a água para produção de cerveja tem alguns requisitos. Sendo assim a água deve ser potável, transparente, incolor, inodora, livre de qualquer sabor estranho, com o pH desejável para trabalho (entre 4 e 9), bom coagulante do *trub* (material mucilaginoso), permissível de uma fermentação asséptica e capaz de desenvolver cerveja com características físico-químicas ideais [19,21].

2.1.1.4 Levedura

As leveduras são microrganismos que atuam durante a etapa de fermentação e realizam a conversão de açúcares em etanol, dióxido de carbono e outros metabólitos. Estes metabólitos são excretados pela levedura e apresentam elevada importância sensorial [22].

Do ponto de vista microbiológico, a levedura é um fungo unicelular, de forma esférica ou elíptica com tamanhos na ordem de 10 µm [23]. Por serem fungos, são seres eucarióticos, heterotróficos, possuem glicogênio como material de reserva, membrana citoplasmática lipoprotéica e contam com parede celular rígida capaz de resistir às pressões mecânicas e osmóticas [23,24].

Nem toda levedura é aplicada para converter açúcar em etanol, sendo que algumas delas são utilizadas por sua capacidade de agirem como bioflavorizantes. Quanto à aplicação na cerveja, as leveduras mais usadas são a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces pastorianus* [11,12].

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é responsável pela fermentação de topo, que ocorre em cervejas *ale*. A fermentação de topo é conhecida pela sua posição durante o processo fermentativo causada pela produção de CO₂ a partir da flotação e ocorre de maneira ótima com temperaturas entre 17 e 25 °C [11,25]. Já a *Saccharomyces pastorianus* é responsável pelas cervejas de baixa fermentação, ou seja, cervejas do tipo *lager*, que sofrem sedimentação a partir da floculação. Diferente do processo de fundo, as temperaturas de maior eficiência para esse processo são mais baixas com faixa de temperatura entre 8 e 15 °C [26].

A estrutura genética desta levedura é um pouco mais complexa que a da *S. cerevisiae*, com diversas discussões sobre o assunto [27]. Por um longo tempo, ela foi considerada como um híbrido entre a *S. cerevisiae* e outra levedura do mesmo gênero que possuísse criotolerância como característica. Em decorrência do trabalho de Libkind e colaboradores (2011), foi proposto que essa segunda levedura seria a *S. eubayunus*, uma levedura isolada a frio, cuja origem ainda é muito discutida [28].

Além das leveduras convencionais, outras leveduras podem ser usadas em produção de cerveja, tal como a *Brettanomyces* (*B. bruxelensis* e *B. anomala*) para produzir estilos tais como a *Lambic* [29-31]. Além dessas espécies, leveduras selvagens podem estar presentes na bebida e são descritas como qualquer espécie presente no meio que não é intencionalmente inoculado [26].

2.1.1.5 Outros aditivos

Ainda existe uma diversidade de receitas e possibilidades que contam com a adição de nutrientes e outros componentes. Esses produtos extras adicionados podem vir na forma de adjuntos, materiais coadjuvantes e suplementos minerais e seguem a regulamentação específica de cada país. No Brasil, é determinado que

esses aditivos devem ser especificados no rótulo e estar de acordo com as resoluções diretas colegiadas (RDCs) no. 64/2011 [32] e nº 65/2011 [33] da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e com a instrução normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019 [1] do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Adjuntos são os materiais que auxiliam na fonte de carboidratos não maltados diferentes daqueles adicionados pelos maltes [11]. Essa é uma alternativa comum aplicada para redução de custos em cervejarias e pode ser aplicada com ambos os tipos de adjuntos: açucarados e amiláceos [15]. Em adjuntos açucarados, são usados xaropes de cereais, sendo o xarope de milho a forma majoritária de aplicação, além do uso de açúcar comum e açúcar invertido na forma de xarope de frutose e glicose advindos de cana-de-açúcar ou beterraba sacarina [11].

Já os adjuntos amiláceos são produtos de cereais/vegetais ricos em carboidratos, e podem ser exemplificados com seu uso na forma de quirera (arroz) e *gritz* (milho), que são itens tradicionalmente empregados em todo o mundo. É importante destacar que o malte possui enzimas capazes de processar o amido e, conforme o MAPA (2019) [1], o adjunto pode representar até 45% em peso em relação à matéria prima malte, extrato primitivo ou extrato de malte para a elaboração do mosto.

Aditivos alimentares também podem ser adicionados na cerveja, seguindo a resolução RDC no. 65 de 2011 da ANVISA [33]. Nestes aditivos encontram-se reguladores de acidez, antiespumantes, antioxidantes, aromatizantes, corantes e estabilizantes que podem ser aplicados como auxílio no acabamento do produto.

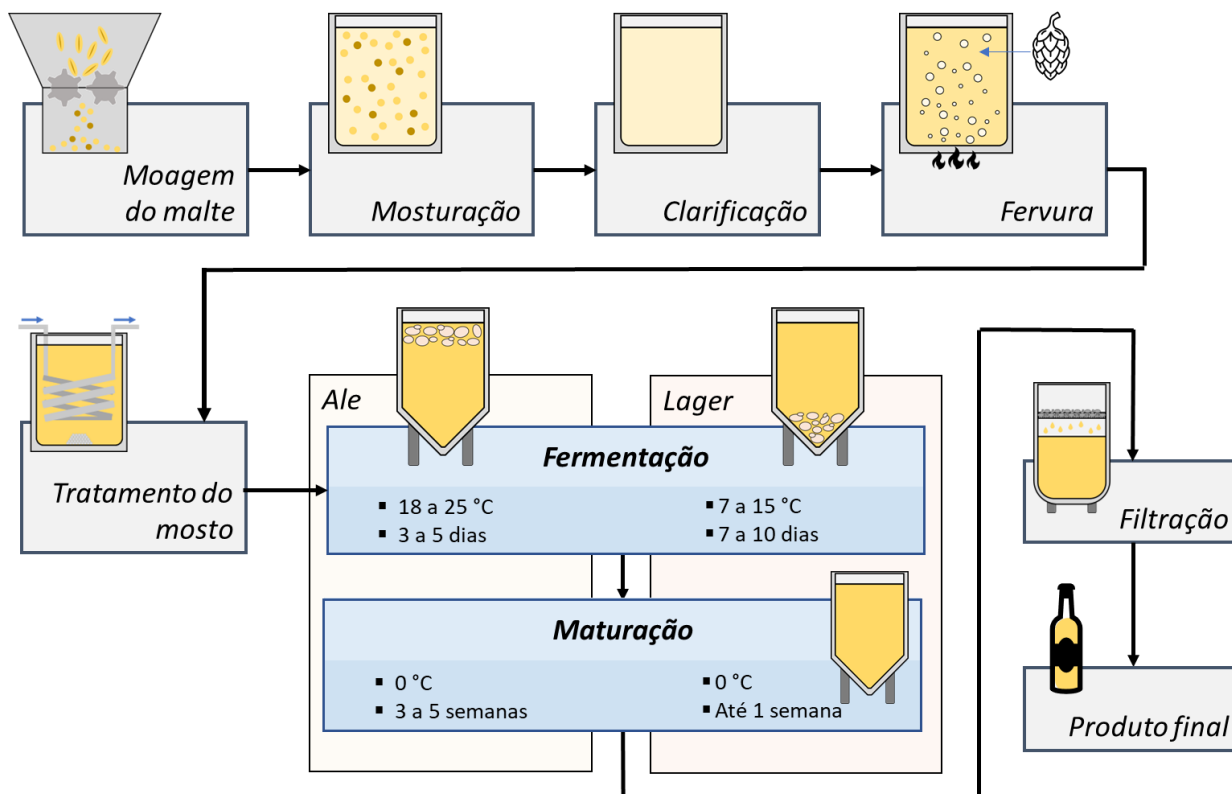
Ainda podem ser utilizados materiais coadjuvantes, que são itens que atuam de forma indireta na produção da cerveja e são regulados pela resolução RDC no. 64 de 2011 [32]. Nesta resolução fica permitido o uso de coadjuvantes com a função de agente de clarificação/filtração, agente de controle de microrganismos (apenas em tratamento de leveduras), fermento biológico, nutrientes para a levedura, detergente, gás para embalagens e resina de troca iônica.

2.2 Processo de produção

O processo de produção da cerveja pode ser realizado tanto de modo industrial quanto artesanal e, em ambos os casos, o processamento pode ser dividido em três etapas. Essas etapas são a produção do mosto, o processo fermentativo e o acabamento da cerveja. Apesar destas três etapas classificarem bem a produção de

cerveja, ainda existem sub-etapas que podem ser vistas na **Figura 2.3** e são descritas com maior detalhamento no Apêndice A e a seguir.

Figura 2.3: Esquema do processo de produção de cerveja.



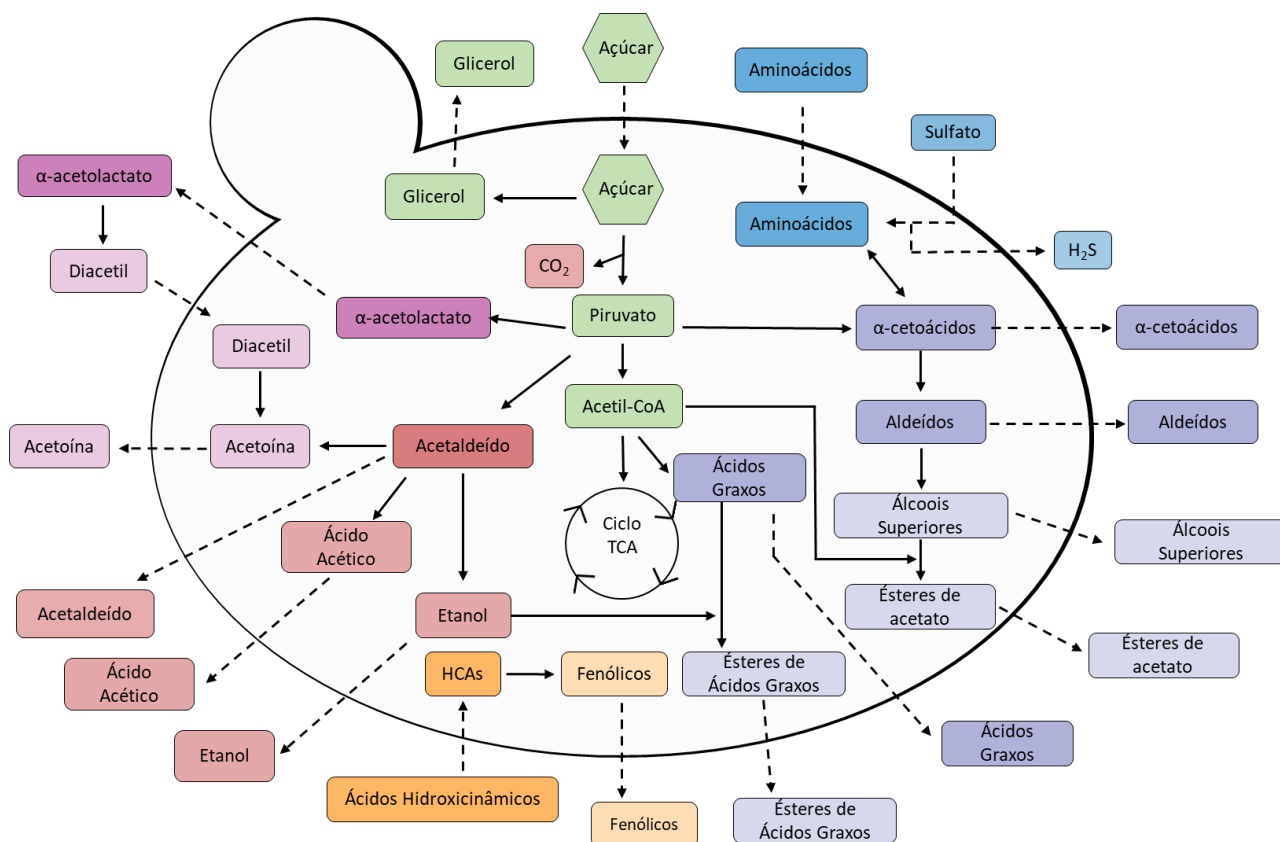
2.2.1 Fermentação

É na fermentação que ocorre grande parte das reações químicas de conversão das matérias primas em cerveja. Dentre os produtos da fermentação, são encontrados metabolitos primários (etanol, CO₂, ácido acético e acetaldeído) assim como diversos metabolitos secundários. A ação da fermentação ocorre com a adição de leveduras, com controle do meio fermentativo almejando a cerveja de interesse [34].

2.2.1.1 Ciclo metabólico

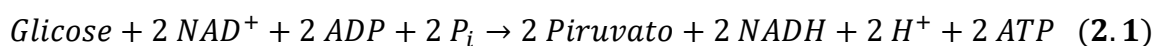
Grande parte das transformações químicas que ocorrem no mosto para conferir as propriedades da cerveja final são advindas de reações bioquímicas desenvolvidas em presença da levedura. A **Figura 2.4** ilustra, de forma simplificada, as alterações que se desenvolvem a partir da levedura, com cores distintas para diferentes processos.

Figura 2.4: Metabolismo simplificado da levedura com a visão geral de produção de alguns de seus metabólitos. TCA - Ciclo do ácido tricarboxílico, HCAs - ácidos hidroxicinâmicos.



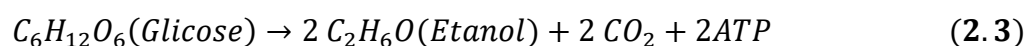
Fonte: Adaptado de Dzialo et al., 2017[34] Copyright © FEMS 2017.

Durante o metabolismo da levedura, ocorrem dois tipos de alterações principais: catabolismo e anabolismo. Nos processos catabólicos, as moléculas são clivadas e oxidadas, com produção de energia química a partir do acúmulo em moléculas de ATP. Já nos processos anabólicos ocorre o inverso, a biossíntese se faz presente com reações de síntese de materiais celulares complexos (proteínas, polissacarídeos, gorduras, dentre outros) e consumo de ATP [22,23]. Desta forma, as leveduras irão catabolizar os açúcares em piruvato pela glicólise (**Equação 2.1**) [11].

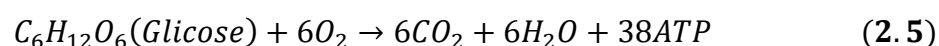
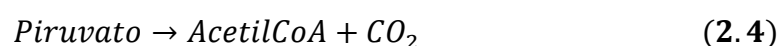


Na fermentação alcoólica, moléculas simples de açúcares são convertidas em acetaldeído para posterior conversão em etanol. O procedimento (**Equação 2.2**) ocorre via reações de oxirredução com participação de diversas enzimas a partir de um processo exotérmico [22]. No caso da glicose, **Equação 2.3**, a relação estequiométrica é dada pela transformação de uma molécula de glicose para duas

moléculas de etanol e duas moléculas de CO₂ e com formação de duas moléculas de ATP.



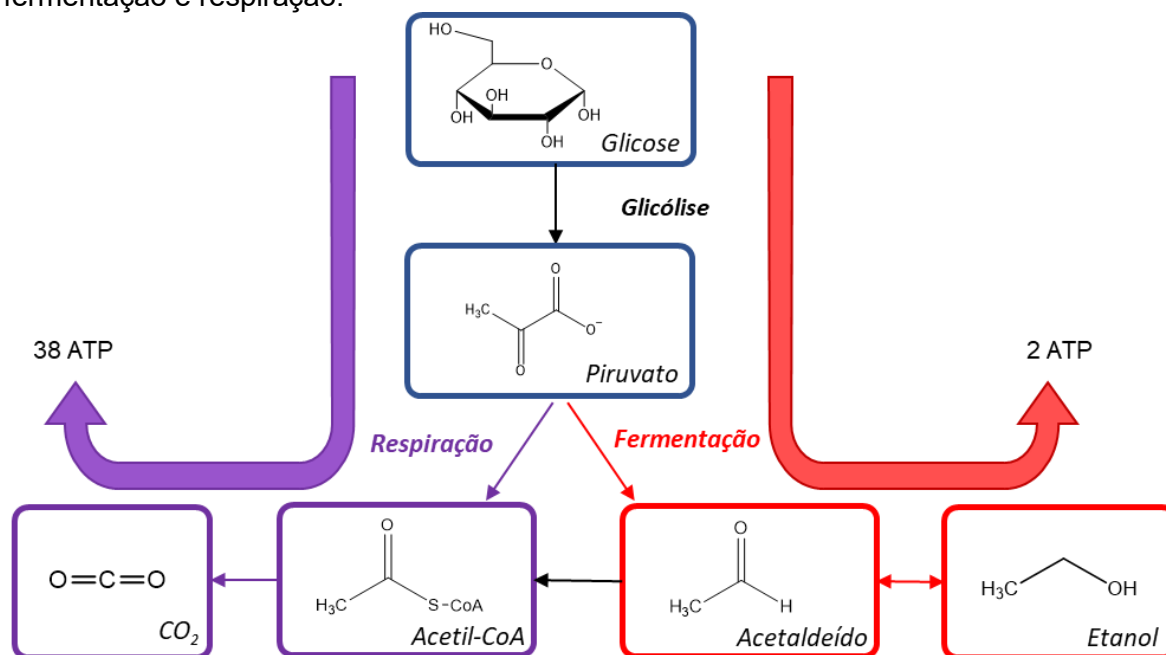
A partir do piruvato, também ocorre o processo de respiração da levedura. Neste caso, em presença de oxigênio, há a conversão de açúcares em Acetil-CoA e CO₂ (**Equação 2.4**) a partir de descarboxilação oxidativa, e cadeia de transporte de elétrons em mitocôndrias, gerando moléculas de ATP em um processo exotérmico. O Acetil-CoA é convertido em CO₂ pelo ciclo de Krebs, e de modo geral a respiração a partir da glicose pode ser apresentada conforme **Equação 2.5**. No caso de ATP neste processo, dois são advindos da glicólise, dois do ciclo de Krebs e 34 do sistema de transporte de elétrons [22,35].



Ambos os processos de respiração e fermentação alcoólica são importantes na produção de cerveja. A respiração ocorre na fase *lag* e tem por objetivo o revigoramento e crescimento da levedura, enquanto a fermentação ocorre com produção de metabólitos de importância cervejeira [36]. Esses processos podem ser representados pelo esquema da **Figura 2.5**.

Em condições anaeróbicas, um maior número de moléculas de glicose é consumido por leveduras fermentativas facultativas, e este efeito é conhecido como efeito *Pasteur*. Enquanto, mesmo em condições aeróbicas, a fermentação é preferencial em comparação com a respiração, e este efeito é conhecido como efeito *Crabtree*. Quando a respiração é comparada com a fermentação, o potencial energético de produção de ATP é maior durante a respiração, porém este fator não faz a respiração ser preferencial. Isto se justifica pelo maior fluxo de produção de ATP durante a fermentação, com maior crescimento da colônia de leveduras e produção de etanol, que é benéfico para a competição das leveduras frente microrganismos que são inibidos por este álcool [22,37,38].

Figura 2.5: Esquema representativo da formação de moléculas cruciais durante as etapas de fermentação e respiração.



Os açúcares fermentescíveis são as fontes de carbono durante o processo fermentativo. Dentre os açúcares fermentescíveis, o mosto contém em sua grande maioria maltose (~59%), seguido de maltotriose (~20%), glicose (~14%), sacarose (~6%) e frutose (~1%). Dentre estes sacarídeos, a levedura tem uma ordem preferencial de consumo dos mesmos, sendo que essa ordem se inicia com os monossacarídeos glicose seguido de frutose [34,35,39].

A complexidade dos açúcares é um fator importante para a levedura, sendo que essa ordem de consumo segue para os dissacarídeos sacarose e maltose, e por fim, o polissacarídeo maltotriose. Esse caráter é justificado pelo metabolismo, onde enzimas atuam para a quebra dos polissacarídeos. No caso da sacarose, a presença da invertase na parte externa da levedura faz com que haja a quebra do açúcar em frutose e glicose, para posterior absorção. Já no caso de maltose e maltotriose, há a entrada deles na levedura para posterior quebra em moléculas de glicose por meio da maltase. Esse processo é expresso pela **Figura 2.6**, onde há a formação de piruvato e posterior formação de CO_2 e etanol [12,25,39].

Aminoácidos são outra fonte de nutrientes essenciais para o crescimento da levedura. Eles são fontes de nitrogênio, geralmente estão presentes no mosto e possuem diferentes tipos de compostos com sua absorção ocorrendo pela levedura juntamente com pequenos peptídeos (**Tabela 2.3**), em que os grupos podem ser

divididos conforme sua absorção pela levedura. Da mesma forma que o grupo C, a amônia presente no mosto também tem absorção lenta pela levedura [40].

Figura 2.6: Consumo de carboidratos pelas leveduras em processo de fermentação de mosto cervejeiro.

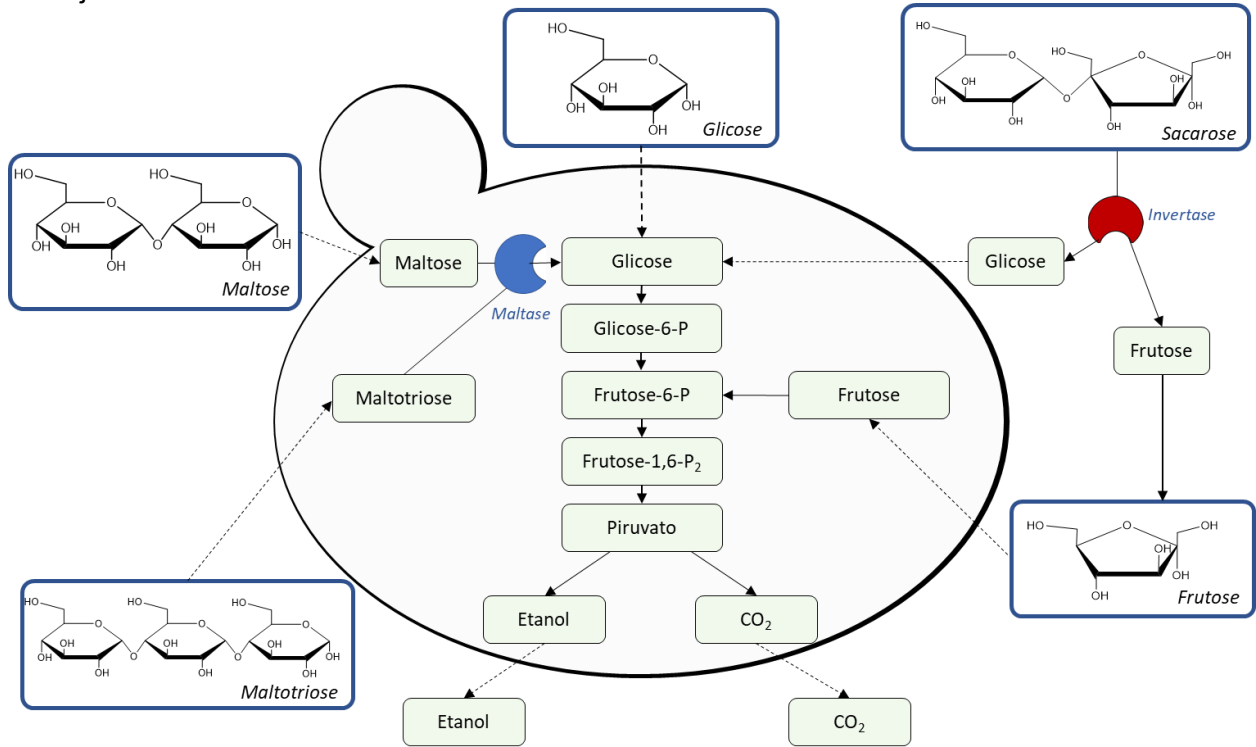


Tabela 2.3: Ordem da captação de aminoácidos durante o processo de fermentação.

Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
<i>Absorção rápida</i>	<i>Absorção intermediária</i>	<i>Absorção lenta</i>	<i>Absorção baixa ou não existente</i>
Ácido glutâmico	Valina	Glicina	Prolina
Ácido aspártico	Leucina	Fenilalanina	
Asparagina	Isoleucina	Tirosina	
Glutamina	Histidina	Triptofano	
Serina		Alanina	
Metionina			
Treonina			
Lisina			
Arginina			

Fonte: Stewart, 2017 [40].

Os aminoácidos presentes no meio são expressos a partir de compostos livres, também conhecidos como grupos amino nitrogênio livres (FAN) e são importantes

precursores para a rota metabólica de *Ehrlich*. Esta rota consiste nas etapas de modificação de aminoácidos a partir da desaminação (formação de cetoácidos), descarboxilação (liberação de CO₂ e formação de aldeídos) e redução em álcoois superiores [23,41].

O processo fermentativo ocorre com a diminuição do pH, aumentando-se a concentração de compostos ácidos [42]. Ácidos orgânicos são formados, tais como cetoácidos, ácido acético e ácidos graxos. Ácidos orgânicos, assim como aldeídos e álcoois superiores são formados via rota de *Ehrlich*. Além dessa via, ácidos orgânicos também podem ser formados via metabolismo dos açúcares. Estes ácidos podem influenciar na percepção sensorial, e de modo geral eles tem uma percepção mais azeda. Assim, os ácidos orgânicos principais e seus aromas são: ácido acético (vinagre), piruvato (azedo, salgado), ácido fumárico (azedo), ácido málico (azedo), ácidos graxos de cadeia média (rançoso, gordura) e cetoácidos (queijo) [11,23].

Mais de 40 álcoois superiores já foram descritos como metabólitos secundários da fermentação, mas os mais comuns são o n-propanol, isobutanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol. Esta classe de compostos recebe este nome por englobar todos os álcoois que possuem número de carbono superior ao etanol [40]. Outro nome comum atribuído a essa classe de compostos é álcoois fúseis. Este termo deriva do alemão “fusel”, que significa “bebida ruim” [43].

A síntese dos álcoois superiores se dá por duas vias distintas durante o processo de fermentação: como sub-produto da síntese de aminoácidos a partir de piruvato pela rota anabólica ou a partir do catabolismo de aminoácidos, como é possível ser visto pela parte roxa da **Figura 2.4** (p. 36) [44]. Dentro de uma determinada faixa, os álcoois superiores são considerados *on flavors*, trazendo oleosidade e sabor alcoólico à bebida. Se presentes em excesso, a percepção de oleosidade pode se tornar negativa, além de intensificar sabores herbáceos, sensação de queimação e potencializar os efeitos da ressaca [12].

Os ésteres, assim como os álcoois superiores, estão associados a características sensoriais positivas dentro de uma determinada faixa. A presença destes compostos normalmente é associada a aromas frutados e florais [40]. A produção destes compostos está diretamente ligada ao crescimento da levedura e ao metabolismo de lipídios. A maioria dos ésteres produzidos durante a fermentação pode ser dividida em duas classes, os ésteres de acetato e os metil-ésteres de cadeia média [25].

No primeiro grupo, o agrupamento ácido é o acetato, e o agrupamento álcool é o etanol ou um álcool complexo derivado do metabolismo de aminoácidos. Dentro desta classe podemos citar o acetato de etila, acetato de isoamila e o feniletilacetato [45]. Já o segundo grupo é caracterizado pelo etanol com o agrupamento álcool, e o grupo ácido sendo um ácido graxo de cadeia média [44]. Dentro desta classe podem ser citados o hexanoato de etila, octanoato de etila e o decanoato de etila.

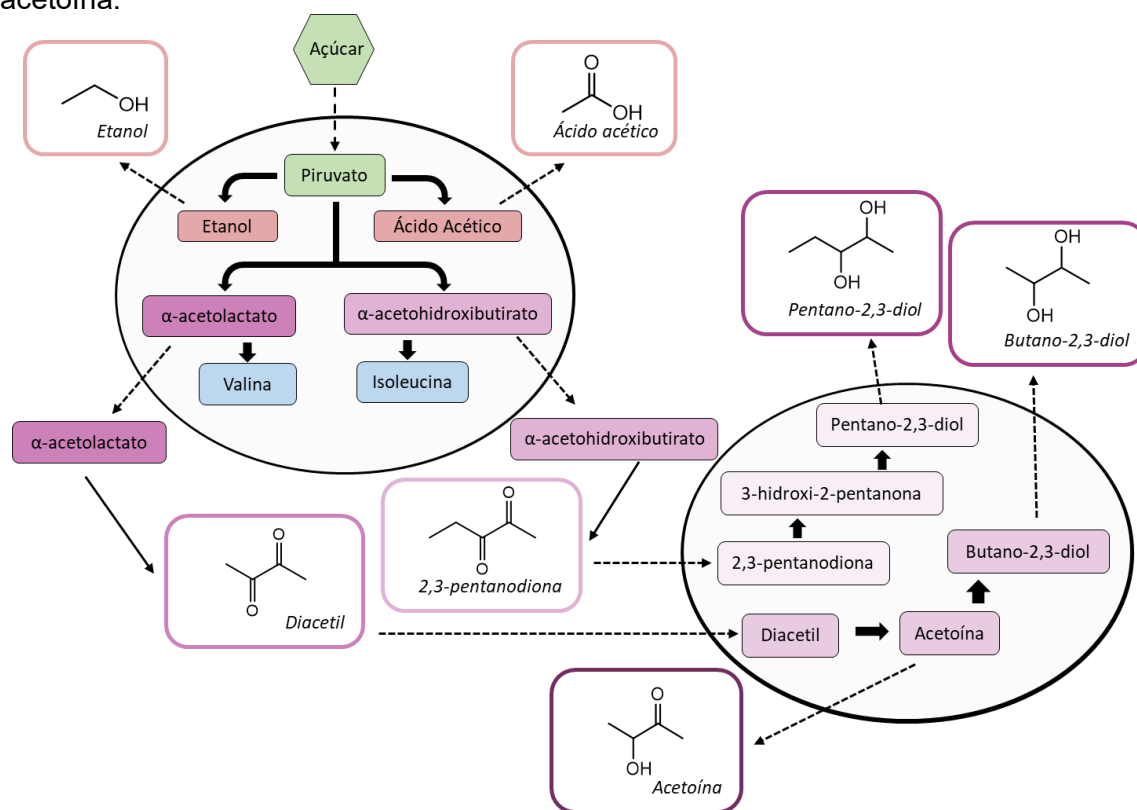
2.2.1.2 Maturação

Ao término do processo de fermentação, a cerveja ainda não está pronta e precisa de alguns acabamentos. Esse produto intermediário é nomeado de cerveja verde (*green beer*) e irá desenvolver características especiais com o “amadurecimento” da bebida na fase de maturação, também conhecida como segunda fermentação ou condicionamento [15,35].

A maturação pode eliminar *off flavours*, tais como diacetil, ácido sulfídrico e acetaldeído, com o aprimoramento de características sensoriais do produto. Um dos processos mais destacados na maturação é a conversão de dicetonas vicinais (VDKs) pela levedura em outros *flavours* (**Figura 2.7**) [40]. Os VDKs são os compostos diacetil (butano-2,3-diona) e pentano-2,3-diona que apresentam aromas de manteiga e durante a maturação irão ser absorvidos pelas leveduras e transformados em compostos como a acetoína, butano-2,3-diol e pentano-2,3-diol.

Nessa etapa, também ocorre clarificação do produto a partir da decantação natural de proteínas e leveduras, diminuindo mais uma vez a turbidez da cerveja, além de ocorrer a saturação de gás carbônico e evitar a oxidação da bebida [12].

Figura 2.7: Rotas metabólicas de formação e conversão de *off flavours* diacetil e 2,3-pentanodiona em compostos de melhor percepção sensorial: pentano-2,3-diol, butano-2,3 diol e acetoína.



2.2.2 Finalização do produto

Após a maturação, a cerveja está quase pronta para o consumo, e é na finalização da bebida que processos físicos para melhoria da percepção da bebida pelo consumidor ocorrem. Processos como clarificação, carbonatação e pasteurização acontecem nesta etapa. Na clarificação, irá ocorrer a separação de todos os particulados indesejados que ainda estão presentes na cerveja (proteínas, leveduras, taninos, dentre outros) a partir de filtros tais como filtros de prensa, com terra diatomácea e filtros de membrana.

Na carbonatação ocorre adição de CO₂ para melhoria na sensação de boca e correção do gás carbônico produzido durante a fermentação. Outra operação importante para reduzir a atividade de microrganismos prejudiciais e conferir estabilidade biológica para a bebida é o uso de técnicas de pasteurização a partir de técnicas que envolvem aquecimento da cerveja em temperaturas próximas a 65 °C, como uso de trocadores de calor e túnel de pasteurização. Desta forma, a bebida é envasada e levada ao cliente por meio de garrafas âmbar, *growlers*, *kegs* e latas, e

todas elas devem proteger a cerveja da incidência de luz UV que podem degradar a bebida e gerar *off-flavours* [12,15,24].

2.2.3 Qualidade da cerveja

A qualidade da cerveja pode ser avaliada por diferentes parâmetros de caracterização da bebida final. Para análise destes parâmetros, ensaios como os físico-químicos são realizados. Na legislação brasileira (Instrução normativa no. 65 de 10 dez. 2019) são preconizados o teor alcoólico (ABV- álcool por volume) entre 0,5 e 54% v/v à 20 °C, extrato primitivo (OE) com no mínimo 5% m/m e cor por valores estabelecidos pela EBC (Convenção europeia de cervejeiros) [1].

Os parâmetros de qualidade da bebida podem ser analisados tanto pelos substratos, quanto pelos metabólitos que foram produzidos. Dentre os substratos, os açúcares, FAN e as leveduras podem ser determinados. Na perspectiva de metabólitos, é comum medir o teor de etanol, o amargor por seu IBU, a presença do *off flavour* VDK, o pH da bebida, assim como a presença de ácidos orgânicos [11,34,43].

O extrato da cerveja e mosto são utilizados para análise dos sólidos presentes na bebida na forma de componentes dissolvidos. Eles podem ser representados por porcentagem em peso (% m/m) ou por graus Plato (°P), que é expresso como a porcentagem de açúcares em uma certa porção do líquido. Os extratos são comumente caracterizados por extrato primitivo ou original (OE), extrato real (RE) e extrato aparente (AE).

OE refere-se à quantidade de substâncias sólidas no mosto antes de ocorrer a fermentação, enquanto RE pode ser usado durante todo o processo produtivo. O extrato real é relacionado com o corpo da cerveja e representa todos os sólidos que compõem a cerveja, principalmente as dextrinas, proteínas e açúcares. Já o extrato aparente leva em consideração a presença dos extratos juntamente com o etanol na composição da bebida, e por esse motivo é medido após a fermentação ocorrer [41,46,47].

A partir do valor de OE, o MAPA determina a classificação das cervejas em: cerveja leve (entre 5,0 e 10,5% m/m), cerveja (entre 10,5 e 12,0% m/m), cerveja extra (entre 12,0 e 14,0% m/m) e cerveja forte (acima de 14,0% m/m) [3].

O pH do mosto cervejeiro reduz com o tempo de fermentação e atinge valores próximos a 4 quando a cerveja atinge o estágio de consumo. Além dos valores de pH,

a bebida também pode ser caracterizada a partir de acidez total, fixa e volátil. A acidez total caracteriza a presença de todos os compostos ácidos tituláveis presentes na cerveja, a acidez volátil determina a concentração dos ácidos voláteis formados no processo fermentativo (ácido fórmico, acético, dentre outros) e a acidez fixa representa a concentração de ácidos que não são voláteis [35,39,46].

Outra propriedade de interesse é a percepção sensorial da cerveja. A primeira percepção que o consumidor analisa é a coloração da bebida e este padrão visual segue escalas de cores conforme a EBC ou a SRM (Método de referência padrão). Outro parâmetro bem característico da cerveja é o amargor relativo à quantidade de iso- α -ácidos expresso por unidades de IBU [46,48].

A presença de contaminantes, que são compostos que podem ser prejudiciais para a saúde do consumidor também deve ser analisada para confirmar a qualidade da bebida. Como exemplo, em um trabalho desenvolvido durante este doutorado foi proposto com um método para detecção de dietilenoglicol (DEG) em cervejas [49]. Este contaminante foi detectado em cervejas produzidas por uma cervejaria localizada em Belo Horizonte (MG) em 2020. No método proposto foi avaliado o uso de infravermelho próximo (NIR) como método rápido para aplicação na forma de *screening*.

2.3 Voláteis

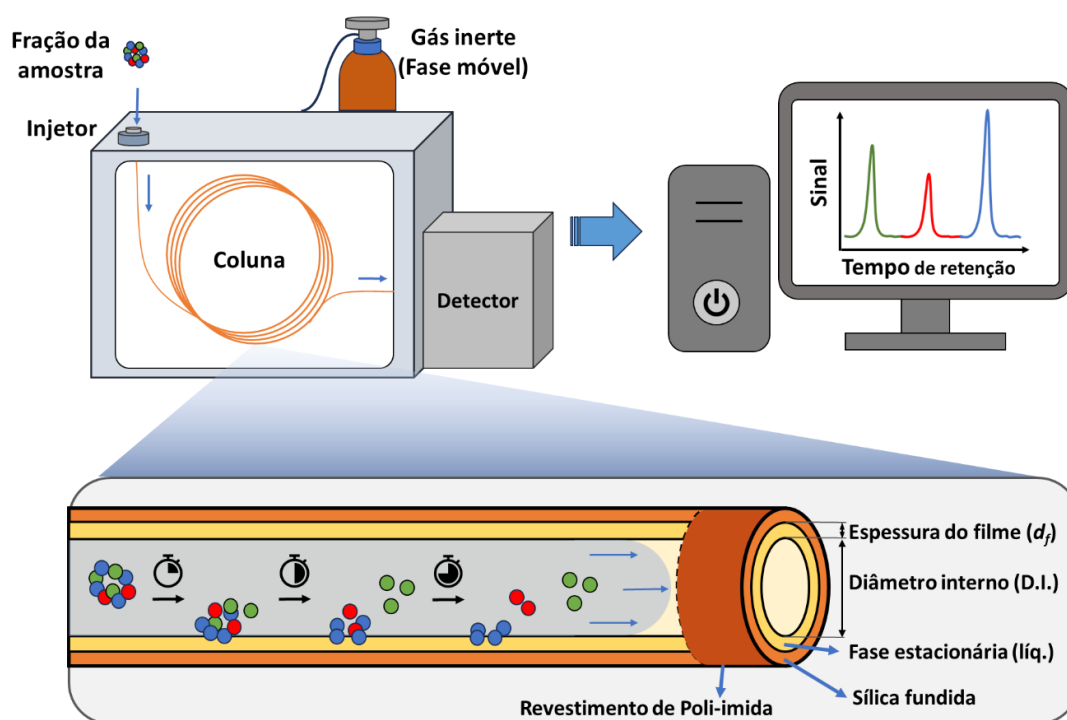
Compostos voláteis, ou compostos orgânicos voláteis (VOCs), são uma ampla variedade de substâncias que possuem alta pressão de vapor em condições normais e consequentemente tem o potencial de se volatilizarem mais facilmente. Eles são importantes em amostras ambientais, farmacêuticas, biomédicas, produtos naturais, criminalística, arqueológicas, dentre outras. Desta forma, a detecção de voláteis é fundamental para caracterização das amostras e avanços em diferentes campos de estudos.

2.3.1 Cromatografia a gás (GC) e cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC $\times$ GC)

Uma das formas mais aplicadas para a determinação de voláteis em amostras, incluindo as amostras de alimentos é a cromatografia a gás (GC). Essa é uma técnica baseada na separação de amostras voláteis e semivoláteis que sejam termicamente

estáveis. A análise de compostos com menor volatilidade também é possível a partir de metodologias como a derivatização de amostras. Para uma melhor visualização do sistema cromatográfico, na **Figura 2.8** são apresentados os componentes do sistema, que possui linha de gás, injetor, forno de GC, coluna capilar e detector. O princípio da técnica se baseia na diferença de interação dos analitos com a fase estacionária presente na coluna, enquanto ele é transportado por um gás inerte (Ex.: He, H₂ e N₂), também conhecido como gás de arraste, levando a separação dos analitos. Essa separação ocorre em colunas cromatográficas geralmente longas (de 10 a 100 m) e finas (de 0,1 a 0,53 mm).

Figura 2.8: Sistema de cromatografia a gás (GC) com representação do sistema cromatográfico, separação pela coluna capilar e aquisição de dados.



Mais especificamente, a GC convencional do tipo cromatografia gás líquido tem a fase estacionária na forma de um líquido não volátil, ou filme fino (0,1 a 5,0 μm d_f), presente na superfície interna da coluna capilar composta de sílica fundida (SiO₂) com filmes retidos por adsorção ou ligação química [50-52].

Uma vez que um pequeno volume de amostras ($\sim 1 \mu\text{L}$) é injetado no sistema cromatográfico, a amostra atravessa um septo de borracha e é levada a um *liner* aquecido antes de ser direcionado a coluna. Dependendo da amostra, a forma de

injeção pode variar, podendo ser por injeção com divisão de fluxo, sem divisão de fluxo e diretamente na coluna [50,51].

As colunas cromatográficas são a parte onde as interações entre fase móvel, analito e fase estacionária ocorrem. A natureza da matriz irá ditar a seletividade do tipo de coluna para uma melhor separação, onde colunas apolares tem uma performance melhor para compostos apolares e colunas polares tem uma performance melhor para compostos polares. Além da polaridade, outra característica de suma importância para uma separação correta e sem danos a fase móvel é o uso da faixa correta de temperatura, onde excesso de temperatura pode danificar a coluna.

Considerando a ordem crescente de polaridade, fases como dimetilpolisiloxilano, 5% difenil/ 95% dimetilpolisiloxilano e polietilenoglicol (Wax) são comumente encontradas no mercado com nomes comerciais conforme o fabricante. Outras fases estacionárias também podem ser encontradas, tais como líquido iônico, que possuem alta polaridade ou mesmo colunas quirais, com a capacidade de separar enantiômeros.

Uma das formas de identificação de analitos pela GC é expressa pelo índice de retenção (RI ou I), determinado pela comparação do tempo de retenção do analito com a injeção de uma série de alcanos lineares, ilustrando os tempos de retenção relativos das substâncias com a variação das condições de injeção, coluna, fase estacionária e temperatura de ebulição do soluto. Este índice é expresso por valores numéricos absolutos, em que os alcanos lineares são representados por múltiplos de 100 do número de átomos de carbono do alcano, identificando a posição do analito. Os valores experimentais são então comparados com a literatura de acordo com a fase estacionária e o tipo de índice de retenção. Eles podem ser calculados a partir do índice de retenção de Kovats (**Equação 2.6**) [51] para condições isotérmicas ou por Van den Dool e Kratz (**Equação 2.7**) [53] para quando há rampa de temperatura.

$$I_x = 100 \left[n + (N - n) \frac{\log t_x - \log t_n}{\log(t_N) - \log(t_n)} \right] \quad (2.6)$$

$$I_x = 100n + \frac{100(t_x - t_n)}{(t_N - t_n)} \quad (2.7)$$

Onde: ' I_x ' é o índice de retenção, ' n ' é o número de carbonos no alcano anterior ao analito, ' N ' é o número de carbonos no alcano posterior ao analito, ' t_x ' é o tempo de

retenção do analito, ' t_n ' é o tempo de retenção do alcano anterior ao analito e ' t_N ' é o tempo de retenção do alcanos após o analito.

A combinação entre GC e detectores, expande a capacidade de detecção a partir da possibilidade do aumento da seletividade e sensibilidade da técnica. Dentre eles, podem ser citados os detectores de ionização por chama – FID, captura de elétrons – ECD, fotométrico de chama – FPD para fósforo e enxofre, condutividade térmica – TCD, infravermelho com transformada de Fourier – FTIR e espectrômetro de massas – MS [51]. A escolha do tipo de detector irá depender da faixa de concentração do analito na amostra, complexidade da matriz, tipo de amostra, objetivo da análise, além de limitações financeiras e de disponibilidade do tipo de detector.

O uso de MS como detector é vantajoso por ser aplicável a um diverso grupo de compostos, possuir baixos limites de detecção, além de auxiliar na determinação do composto pelo seu espectro de massas, podendo ser usado tanto quali quanto quantitativamente. O uso de MS como detector e sua capacidade de aplicação pode ser comprovado por uma pesquisa rápida na base de dados Web of Science (pesquisa no dia 15 dez. 2023), onde o termo “*gas chromatography*” retorna um valor de 188.613 artigos, frente ao resultado de “GC–MS” e “*gas chromatography-mass spectrometry*” que possui 132.260 artigos, representando 70,12% dos números apresentados. O sinal analítico do MS é dado pela razão massa-carga (m/z) e em GC–MS a detecção pode ser dada por cromatograma de íon total ou a partir do monitoramento seletivo de íons.

Quando os íons gerados chegam ao detector ocorre a formação um sinal elétrico e a intensidade deste sinal elétrico é convertido em um valor numérico que varia em função do tempo da corrida cromatográfica. A partir daí, os resultados são expressos pelo cromatograma que descreve a separação de compostos com o tempo de retenção expresso no eixo x versus o sinal analítico no eixo y. Parâmetros como programação de temperatura, fluxo de gás, tipo de fase móvel e injeção de divisão de fluxo (*split*) podem melhorar a separação dos analitos. Mesmo após escolha dos parâmetros ideais, muitas amostras ainda não conseguem ter um cromatograma com picos com boa resolução, ou seja, possuem baixa capacidade de separação. Desta forma, novos desenvolvimentos frente a GC continuam a ocorrer.

A GC é relatada como uma técnica desenvolvida em meados de 1930, porém seu grande avanço começou com o desenvolvimento da cromatografia gás-líquido em 1952 pelos pesquisadores James e Martin [54], levando ao desenvolvimento de

colunas capilares por Golay em 1958 [55] e o uso de espectrômetro de massas como técnica hifenada ao GC em 1959 por McLafferty e Gohilke [56]. A evolução da técnica foi constante, com uso de detectores com tecnologias atuais que amplificam o potencial da técnica assim como a espectrometria de massas com tempo de voo (TOF), alta resolução (HRMS) além do desenvolvimento de GC–MS portátil [57]. Um dos grandes marcos da cromatografia ocorreu por Liu e Phillips (1991) [58], onde se originou a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC).

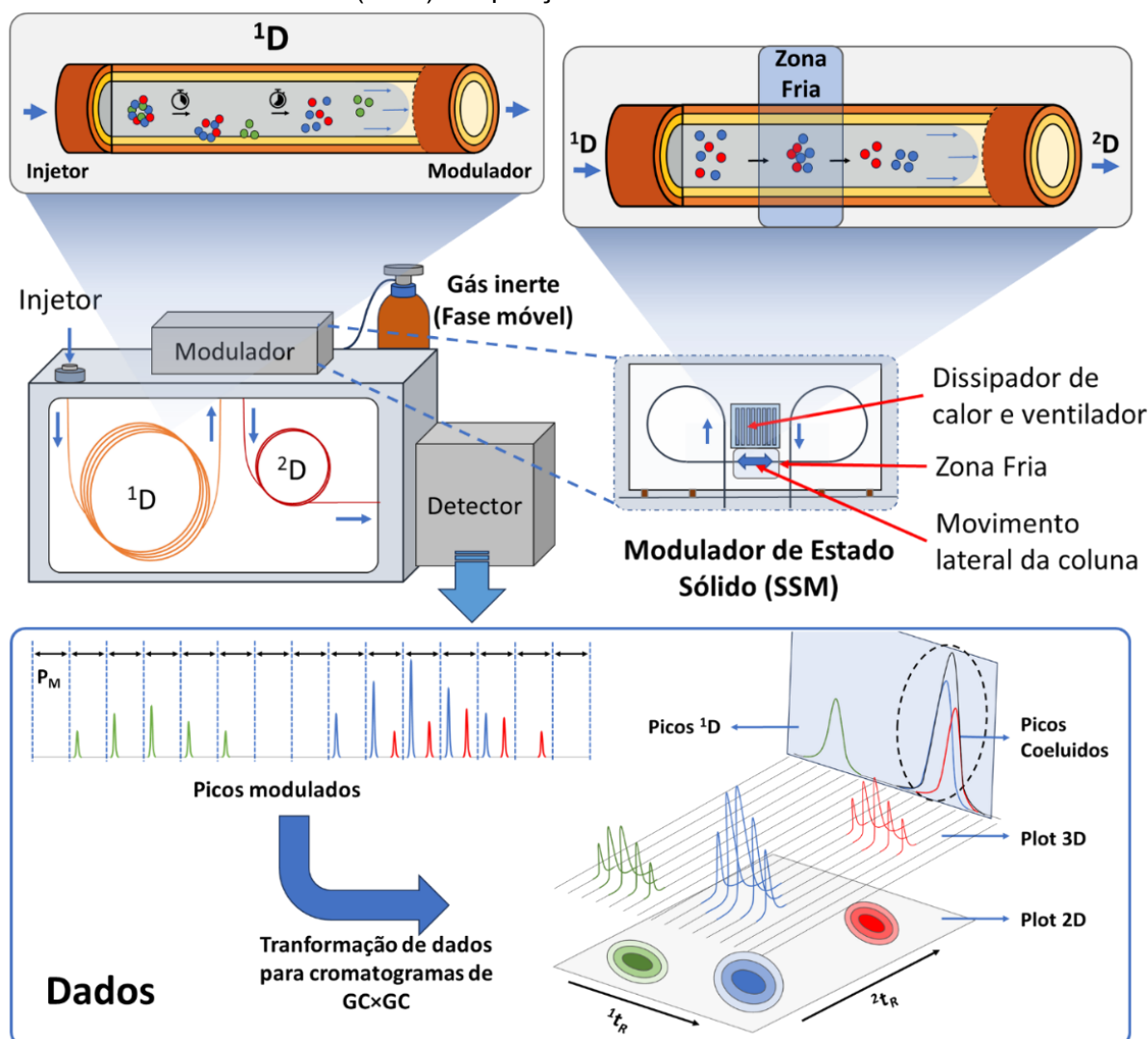
A GC×GC faz parte de um campo de técnicas conhecidas como cromatografia gasosa multidimensional (MDGC). Como a morfologia da palavra descreve, esse campo envolve mais de uma dimensão de separação, ou seja, no contexto cromatográfico há presença de mais de uma coluna. Em consequência do uso de mais de uma dimensão apresentam-se múltiplas configurações para o sistema, como a “*heart-cut*” (H/C), representado por um hífen (“-”) ou n-traço (*n-dash*, “-”), ou a cromatografia abrangente, representada pelo símbolo de multiplicação (“×”) [59,60].

Para uma técnica se intitular como abrangente, todo o conteúdo que estiver presente em uma coluna deve passar por todas as outras colunas do sistema, enquanto na H/C apenas uma fração dos analitos é enviada para outra coluna. De modo geral, normalmente os estudos de H/C são usados em análises alvo (do inglês, *targeted*), enquanto a GC×GC é mais aplicada para estudos globais (do inglês, *untargeted*).

A GC×GC foi desenvolvida resolvendo algumas das limitações da GC convencional, também conhecida como cromatografia a gás unidimensional (1DGC). Dentre essas limitações estão a capacidade de pico, razão do sinal-ruído (S/N) e sensibilidade [61]. A configuração da GC×GC pode ser vista com mais detalhes na **Figura 2.9**, com a presença de dois novos componentes não presentes na GC convencional: o modulador e a segunda coluna. O uso do modulador tem o papel de separar e transferir eluentes da ¹D para a ²D, objetivando aumento da resolução pelo aprisionamento em baixa temperatura e liberação dos analitos com frequências maiores que a largura dos picos na ¹D, permitindo a separação na ²D [62]. Já a coluna da ²D é menor para garantir a eluição de todos os compostos durante o período de modulação. Existem duas categorias gerais de moduladores, térmicos e pneumáticos, sendo que os moduladores térmicos podem ser criogênicos ou baseados em aquecimento [63]. Dentro desses moduladores pode ser citado o modulador de estado sólido (SSM) usando sistema de resfriamento por Peltier, onde uma coluna especial é

movimentada lateralmente para aprisionar os compostos na zona fria e liberá-los conforme o período de modulação (P_M).

Figura 2.9: Sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) com representação do sistema cromatográfico, separação pela coluna capilar, componentes do modulador de estado sólido (SSM) e aquisição de dados.



A aquisição de dados ocorre na forma de picos modulados, onde a cada ciclo completo de modulação, ou período de modulação (P_M), há uma fração do cromatograma que representa a $2^{\circ}D$. Conforme a **Figura 2.9**, os dados obtidos são separados e o cromatograma bidimensional pode ser plotado, com o tempo de retenção da $1^{\circ}D$ ($1^{\circ}t_R$) no eixo x e tempo de retenção da $2^{\circ}D$ ($2^{\circ}t_R$) no eixo y. No exemplo pode-se verificar que na ausência da segunda dimensão, os picos azuis e vermelho estariam coeluídos pelo cromatograma $1^{\circ}D$, enquanto os plots 2D e 3D demonstram a separação dos picos [64].

2.3.2 Microextração de fase sólida (SPME)

A etapa de preparo de amostras é crucial para a realização de uma análise confiável, que seja prática e economicamente viável. Esta etapa tem por objetivo realizar a separação dos compostos alvo, além de remover os contaminantes (*clean up*), deixar os compostos de interesse disponíveis para análise (como por exemplo o uso da derivatização) e deixar o analito na faixa de concentração mais adequada para a análise, a partir de pré-concentração ou diluição da amostra. Dentre os diferentes tipos de preparo de amostras descritos para GC, a microextração em fase sólida (SPME) é uma alternativa interessante com algumas vantagens.

Desenvolvida por Pawliszyn e colaboradores em 1990 [65], a SPME é um tipo de preparo de amostras não exaustiva popularizada devido a sua versatilidade de usos, custo efetivo, aplicabilidade e a simplicidade quanto a forma do preparo [66,67]. Esse é um procedimento que tem um apelo pela química verde, uma vez que há redução de solventes quando comparado a técnicas clássicas como a extração líquido-líquido (LLE) e extração de fase sólida (SPE).

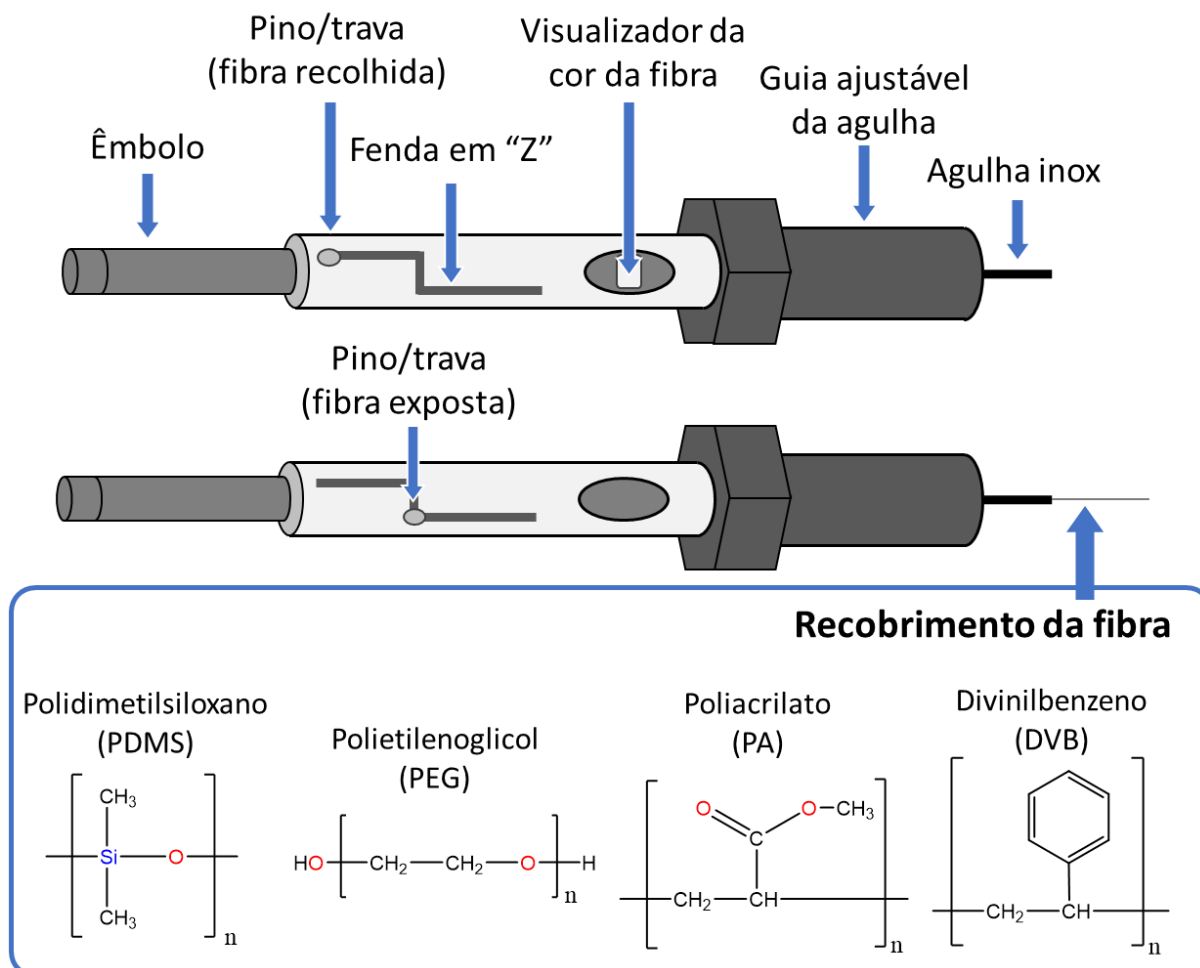
Como uma confirmação do quão verde essa técnica se mostra, a utilização de índices de procedimento de química verde (GAPI) provaram que ela é ambientalmente amigável assim como as ferramentas GREENess (AGREE) e AGREEprep foram aplicadas comprovando que o uso de SPME é um procedimento que corrobora com os princípios da química verde [68-70].

Diferentes tipos de amostras já foram analisados por SPME, como amostras biológicas, pesticidas, amostras ambientais, plantas, amostras de alimentos, dentre outras. Na data de 18 de dezembro de 2024 o número de artigos reportados na literatura com o termo SPME em todos os campos do conhecimento totalizou 14.555 resultados na plataforma Web of Science. Destes números, as duas primeiras áreas de estudo reportadas foram a química analítica com 34,56% do total de artigos e a tecnologia e ciência de alimentos com o valor de 31,09%. Estes números mostram a significância da SPME em pesquisas atuais e que ainda é uma forma de extração que tem muito a oferecer.

A SPME já está difundida no mercado tanto na forma manual, quanto de forma automatizada. Desta forma, para entender melhor como os componentes utilizados

na extração atuam, na **Figura 2.10** estão descritas algumas das partes importantes de um amostrador SPME manual.

Figura 2.10: Amostrador de SPME com a descrição de seus componentes em disposição da fibra recolhida e fibra exposta e representação dos polímeros na forma dos seus monômeros aplicados no recobrimento de fibras.



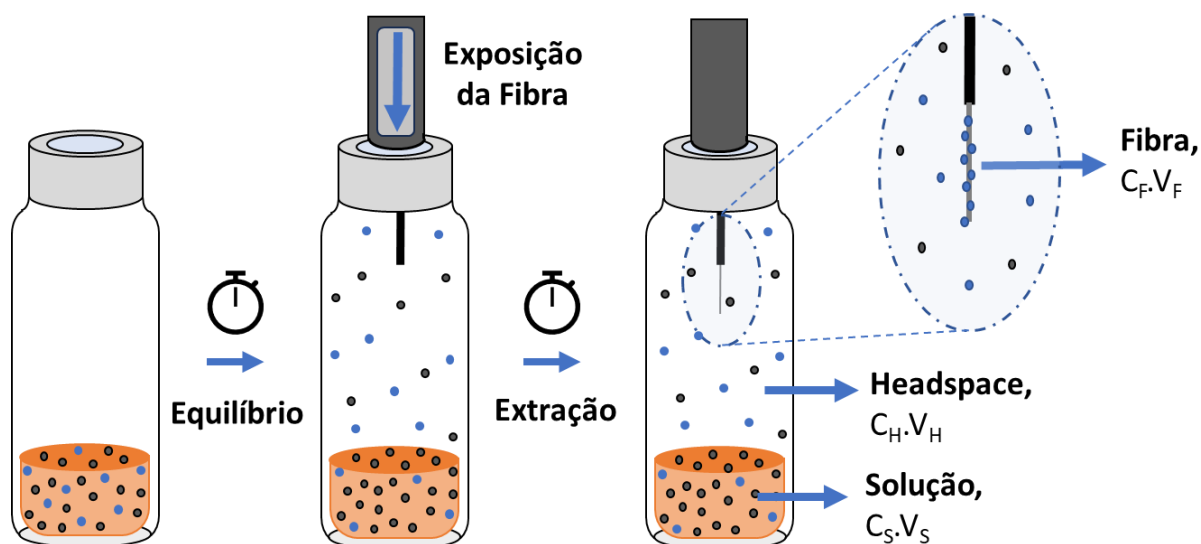
O amostrador demonstrado na primeira parte contém a fibra recolhida, para segurança da fibra que é sensível. Esta fibra é exposta pela movimentação a partir do pressionamento do êmbolo até que o pino ou trava esteja localizada no ponto de trava na fenda em "Z", conforme a segunda exposição da **Figura 2.10**. Dentro do amostrador existe uma mola que facilita a exposição da fibra, que pode ter sua altura ajustada a partir da guia ajustável da agulha. Esse tipo de amostrador favorece a injeção em sistemas de GC, já que a presença da agulha inox pode perfurar o septo do injetor do GC para então a fibra ser exposta e ocorrer a dessorção de analitos. As fibras comerciais são apresentadas por diferentes tipos de cores, representando assim o tipo de revestimento polimérico presente na fibra. Por fim, essa fibra é

constituída de sílica fundida recoberta com uma camada de filme polimérico, onde podem ser observados alguns dos monômeros geralmente aplicados nas fibras de SPME [71].

O modo de exposição da fibra pode acontecer por *headspace* (HS), por imersão direta ou envolvendo uma membrana de proteção, onde a fibra pode ser respectivamente exposta na fase vapor, totalmente recoberta pela solução ou protegida por uma camada que serve como proteção para fibra além de funcionar como *clean up* da matriz [72].

Independente do modo de exposição, o procedimento de SPME possui duas sub-etapas: a etapa do preparo de amostra e a injeção no GC. A primeira, como ilustrado na **Figura 2.11**, se inicia com a adição das amostras na forma aplicável a extração em *vials* fechados com septo perfurável e podendo ser submetido a aquecimento. Este vial é deixado assim até se obter o equilíbrio entre fases, seguido pela inserção da agulha do amostrador e exposição da fibra. Com o vial ainda fechado, a fibra fica exposta pelo tempo necessário para a extração ocorrer eficientemente. Desta forma a fibra pode ser recolhida e levada para a próxima etapa.

Figura 2.11: Esquema de equilíbrio entre amostra, *headspace* e fibra de SPME a partir das etapas de aquecimento e equilíbrio, exposição da fibra e sorção de compostos.



Na etapa relativa ao GC, o amostrador perfura o septo presente no injetor do GC a partir da sua agulha metálica e assim que inserida a fibra é exposta para a dessorção térmica dos analitos com temperaturas altas. Essas temperaturas irão depender do tipo de fibra e das recomendações do fabricante. Por fim, após o tempo necessário

para essa dessorção ocorrer, a fibra pode ser recolhida e o amostrador removido do GC.

As fibras com seus diferentes tipos de polímeros possibilitam a escolha do melhor sistema de extração conforme as propriedades da matriz e analitos. Características físicas, como a espessura do filme tem relação direta com a massa molar (MM) dos analitos extraídos. Isso é causado devido a sorção de altas massas e facilidade de retenção pelo filme. Estes filmes possuem dois mecanismos de extração principais: absorção e adsorção. A absorção se dá pelo filme polimérico em fase líquida frente a adsorção que ocorre em superfícies sólidas porosas [71,73].

Diferentes tipos de fibras de SPME são encontradas comercialmente. Assim, a **Tabela 2.4** apresenta algumas das possibilidades, descrevendo espessura do filme, o tipo de revestimento com a polaridade deste revestimento, além de descrever a sugestão de uso e a faixa da massa molecular extraída pela fibra. Estas fibras, são também apresentadas por escalas de cor, onde por exemplo uma fibra de 50/30 μm DVB/CAR/PDMS possui a cor cinza quando vendido pela Supelco. Conforme o tipo de fibra, também há a recomendação de faixa ideal de pH, temperatura máxima, faixa operacional recomendada para a temperatura, temperatura de condicionamento e seu respectivo tempo.

Tabela 2.4: Algumas das fibras comerciais presentes no mercado, com especificação do tipo de fibra, espessura, uso, mecanismo de extração e faixa de massa molar (g mol^{-1}).

Revestimento da Fibra (polaridade)	Espessura	Sugestão de uso	Mecanismo de extração	Faixa de MM
PDMS (apolar)	100 μm	Compostos voláteis	Absorvente	60-275
PA (polar)	85 μm	Compostos polares semivoláteis	Absorvente	80-300
PEG (polar)	60 μm	Álcoois e compostos polares	Absorvente	40-275
PDMS/DVB (bipolar)	65 μm	Voláteis, aminas e compostos nitroaromáticos	Adsorvente	50-300
CAR/PDMS (bipolar)	85 μm	Gases e compostos de baixa MM	Adsorvente	30-225
DVB/CAR/PDMS (bipolar)	50/30 μm	Análise de sabor. Compostos voláteis e semivoláteis (C3-C20)	Adsorvente	40-275

MM – massa molar; PDMS – polidimetilsiloxano; PA – poliacrilato; PEG – polietilenoglicol; DVB – divinilbenzeno; CAR – carboxeno.

O princípio de funcionamento da SPME ocorre a partir do equilíbrio entre fases, com uma relação de exposição de uma pequena quantidade da fase extratora (revestimento) e da amostra. A extração é considerada completa quando a amostra entra em equilíbrio com o revestimento da fibra. Considerando uma extração com duas fases, a lei de conservação da massa é apresentada conforme **Equação 2.8** e o coeficiente de distribuição entre a fibra e a amostra (K_{FS}) conforme **Equação 2.9**.

$$C_0 V_S = C_S V_S + C_F V_F \quad (2.8)$$

$$K_{FS} = \frac{C_F}{C_S} \quad (2.9)$$

Onde, C_0 é a concentração inicial do analito, V_S e V_F são o volume da amostra e volume da fibra, C_S e C_F são a concentração em equilíbrio do analito na amostra e na fibra, respectivamente.

Para extrações com 3 fases, como na *headspace* (**Figura 2.11**, p.52), a equação de conservação da massa assume a forma da **Equação 2.10** e os coeficientes de distribuição (**Equação 2.11**) são representados pela fibra e o HS (K_{FH}) e pelo HS e a amostra (K_{HS}). Estas equações juntamente com a consideração que $K_{FS} = K_{FH} K_{HS}$ podem ser matematicamente reformuladas para se obter a **Equação 2.12** obtendo a quantidade de analito (n) presente na fibra de SPME.

$$C_0 V_S = C_S V_S + C_H V_H + C_F V_F \quad (2.10)$$

$$K_{FH} = \frac{C_F}{C_H} ; K_{HS} = \frac{C_H}{C_S} \quad (2.11)$$

$$n = \frac{K_{FS} V_F C_0 V_S}{K_{FS} V_F + K_{HS} V_H + V_S} \quad (2.12)$$

Onde, C_H é a concentração em equilíbrio do analito no *headspace*, V_H é o volume do *headspace*.

A partir disto, entendem-se alguns dos parâmetros que influenciam a eficiência da extração via SPME. Dentre eles, tem influência na capacidade extrativa do sistema como a temperatura, pH, o efeito *salting out*, o tempo de extração e de equilíbrio, a agitação da amostra, o volume de amostra e do recipiente de extração [74].

As equações de equilíbrio denotam variáveis como concentração e volume que por consequência irão reger como a extração vai se comportar. Deste modo, variáveis como o volume do frasco e de amostra tem relação direta com a capacidade de equilíbrio. Ou seja, um maior volume de amostra poderá aumentar a sensibilidade da

análise devido a maior presença de analitos no meio, assim como quanto menor o volume do frasco mais rápida se torna a análise.

Variáveis como temperatura e tempo irão influenciar em como o equilíbrio irá ocorrer. O tempo tende a ser um dos limitantes da extração, uma vez que extrações longas levam a redução do número de análises diminuindo a eficiência operacional do método, enquanto tempos curtos podem não possibilitar o equilíbrio do sistema. A temperatura por sua vez induz a liberação de analitos da matriz, onde temperaturas mais altas podem acarretar uma melhora na extração de analitos, mas podem também influenciar na redução de sensibilidade pela fibra de SPME. Sendo assim, o estudo de temperatura e tempo são essenciais para entender como a extração irá acontecer na matriz.

Parâmetros como o *salting-out* e agitação também podem aprimorar a extração de substâncias pela SPME. A inserção de sal na amostra pelo *salting-out* desempenha um papel fundamental na diminuição da solubilidade de analitos mais hidrofóbicos, facilitando a transferência de analitos para o *headspace*. Já a agitação pode provocar a redução no tempo de extração pelo aumento da difusão mássica por fenômenos de transferência de massa entre a amostra para a fibra [74,75].

2.3.3 Voláteis em cerveja

Diversas classes de compostos já foram descritas como relevantes para a composição sensorial da cerveja. A fração de compostos voláteis desta bebida pode conter mais de 800 substâncias diferentes, mas apenas algumas dezenas destes tem relevância sensorial comprovada [43,76]. Estes compostos sensorialmente ativos pertencem principalmente à classe dos álcoois, ésteres, ácidos graxos, compostos carbonílicos, compostos sulfurados, compostos furânicos, monoterpenos, e fenólicos voláteis [45].

Esta grande variedade de compostos tem sua origem nos ingredientes cervejeiros, como a cevada e o lúpulo, no metabolismo da levedura, a partir da excreção de metabólitos secundários e reações paralelas que podem ocorrer durante o processo de armazenamento e maturação [44]. Das possíveis fontes citadas acima, o metabolismo das leveduras é a fonte do maior número dos compostos sensorialmente ativos, e também daqueles que possuem maior relevância, os ésteres e os álcoois superiores [25].

Os compostos orgânicos voláteis (VOCs), também chamados de metabólitos orgânicos voláteis (VOMs) tem descritores importantes dentro do perfil sensorial da cerveja com certo nível de concentração. Na **Tabela 2.5** são apresentados alguns destes VOCs com descrição sensorial e seu respectivo limite de detecção na percepção sensorial.

Tabela 2.5: Alguns compostos orgânicos voláteis (VOCs) associados aos aromas da cerveja.

Classe	Composto	Descritor sensorial	Limiar de percepção (ppm)
Álcoois	2-Feniletanol	Álcool, frutado, mel, rosas, vinho	125
	2-Metil butanol	Álcool, tostado, frutado	65
	2-Metil propanol	Vínico, amargo, maçã, cacau	200
	3-Metil butanol	Rosas, adocicado, perfumado, queimado	70
	Propan-1-ol	Álcool, pungente, bala	800
Ésteres	Acetato de etila	Solvente, frutas, adocicado	30
	Acetato de feniletila	Flores, mel, rosa	3,8
	Acetato de isoamila	Banana, maçã	1,2
	Acetato de isobutila	Maçã, banana, floral, herbal	0,05
	Decanoato de etila	Conhaque, uvas, pera	0,57
	Hexanoato de etila	Conhaque, fruta madura, abacaxi, chiclete	0,21
	Octanoato de etila	Damasco, conhaque, abacaxi, floral, gordura	0,9
Ácidos graxos	Ácido butírico	Azedo, manteiga, queijo	3
	Ácido cáprico	Gordura, grama, poeira	0,2
	Ácido caprílico	Queijo, gordura, grama	2,8
	Ácido capróico	Azedo, pungente, queijo	0,5
Outros	4-vinil guaiacol	Cravo, <i>curry</i> , tempero	0,3
	2,3-Butanediona	Manteiga	0,15
	Acetaldeído	Frutado, folhas verdes	25

Fonte: Fazzalari, 1978 [77]; Olaniran et al., 2017 [43]; Miller, 2019 [78] e León, 2020 [30].

A detecção destes compostos em cerveja é dada majoritariamente a partir de GC com preparo de amostras por microextração em fase sólida e detecção por MS. Na **Tabela 2.6** são apresentados alguns estudos de perfil de VOCs em matrizes de cerveja com diferentes tipos de GC, preparo de amostras e a descrição do tipo de matriz. Devido ao grande número de voláteis produzidos, a cromatografia multidimensional com hifenização em espectrômetros de massas é um artifício que tem sido muito usado. Outro campo de estudo com relevância para estes metabólitos, está nas ciências ômicas, a partir de trabalhos metabolômicos, alimentômicos e cervejômicos [62,79-81].

Tabela 2.6: Alguns métodos de detecção de VOCs em diferentes tipos de cervejas, técnicas instrumentais e procedimento de preparo de amostra

Técnica analítica	Matriz	Preparo de amostra	Nº de VOCs	Referência
GC-FID	Cervejas do mercado chinês (n=18)	HS-SPME com fibra 85 µm de PA	18 (5 álcoois, 7 ésteres, 5 ácidos carboxílicos e 1 outros VOCs)	[82]
GC-MS	Cervejas especiais brasileiras <i>Pilsen</i> e <i>ale</i> (n=30)	HS-SPME com fibra de 50/30 µm DVB/CAR/PDMS	99 (13 álcoois, 9 terpenos, 24 ésteres, 31 aldeídos, 9 ácidos carboxílicos, 9 hidrocarbonetos e 4 cetonas)	[83]
GC-MS	Cervejas com leveduras não <i>Saccharomyces</i> (n=22)	HS-SPME com fibra de 85 µm de PA	20 (6 álcoois, 7 ésteres, 4 ácidos carboxílicos e 3 outros VOCs)	[30]
GC-MS	Diferentes etapas da fermentação de uma cerveja <i>lager</i> (n=8)	HS-SPME com fibra de 50/30 µm DVB/CAR/PDMS	60 (8 álcoois, 5 terpenos, 17 ésteres, 8 aldeídos, 4 ácidos carboxílicos, 9 cetonas e 9 outros VOCs)	[84]
GC-FID e GC-MS	Cerveja <i>lager</i> com diferentes lotes (n=22)	HS-SPME com 4 fibras: 100 µm PDMS, 85 µm PA, 50/30 µm DVB/CAR/PDMS e 65 µm PDMS/DVB	57 (9 álcoois e ésteres, 15 componentes do óleo de lúpulo e 33 outros VOCs)	[85]
GC-MS	Vinagres (n=6), whiskies (n=3), cervejas (n=3), <i>sourdough</i> (n=3) e vinho (n=6)	LLE e injeção com razão de split 100:1 em corrida cromatográfica de 5 min	40 (14 álcoois, 11 ésteres, 10 ácidos orgânicos e 5 aldeídos e cetonas)	[86]
GC×GC-TOFMS	Cervejas <i>lager</i> do mercado português (n=6)	HS-SPME com 4 fibras: 50/30 µm DVB/CAR/PDMS, 85 µm PA, 100 µm PDMS e 65 µm PDMS/DVB	700-800 e seleção de 32 VOCs (5 ácidos, 5 álcoois, 4 aldeídos, 9 ésteres e 8 outros VOCs)	[76]
GC×GC-TOFMS	Cerveja, sidra, vinho branco e tinto (n=4)	mSBSE PDMS/EG-Silicone, DHS, VALLME, SPE e HS-SPME (50/30 µm DVB/CAR/PDMS)	166 para cerveja	[87]
GC×GC-TOFMS	Cervejas do tipo <i>Trapista</i> e artesanais (n=24)	HS-SPME (85 µm CAR/PDMS), mSBSE (PDMS/EG-Silicone), SBSE (PDMS), SHS, DHS	150-500	[88]

VOCs- Compostos orgânicos voláteis; GC- Cromatografia a gás; FID- Detector de ionização de chamas; HS- *Headspace*; SPME- Microextração de fase sólida; PA- Poliacrilato; MS- Espectrometria de massas; DVB/CAR/PDMS- divinilbenzeno-carboxeno-polidimetilsiloxano; PDMS- polidimetilsiloxano; PDMS/DVB - polidimetilsiloxano -divinilbenzeno; LLE- Extração líquido-líquido; GC×GC- Cromatografia gasosa bidimensional abrangente; TOFMS- Espectrometria de massa com tempo de voo; mSBSE- Múltipla extração sortiva com barra de agitação; DHS- *Headspace* dinâmico; VALLME- Microextração líquido-líquido assistida por vórtex; SPE- Extração de fase sólida; EG- Etilenoglicol; SBSE- Extração sortiva com barra de agitação; SHS- *Headspace* estático.

2.3.4 Voláteis em lúpulo

Como descrito na seção de 2.1.1.1, o lúpulo é uma matéria prima fundamental no processo produtivo da cerveja. Uma parcela dessa importância é dada pela caracterização do aroma do produto acabado por substâncias que advêm desta planta, como a fração presente nos óleos essenciais com presença de compostos como terpenos, ésteres e álcoois.

Para a análise adequada desses compostos, o preparo de amostra é uma etapa de extrema importância. Sun et al. [89] revisaram trabalhos com diferentes métodos de preparo de amostras, como destilação a vapor [90,91], extração simultânea por destilação [92], *headspace* dinâmico [93] e estático [94], dessorção térmica direta [95], dessorção direta por micro-ondas [96], extração líquido-líquido (LLE) [97], extração sortiva por barra de agitação (SBSE) [98] e microextração em fase sólida de *headspace* (HS-SPME) aplicada ao lúpulo [99,100].

O uso de técnicas como a GC×GC são interessantes para o estudo da composição de voláteis em lúpulos devido às vantagens já apresentadas na seção 2.3.1. A aplicação da GC×GC na análise de lúpulo (**Tabela 2.7**) foi relatada por 13 estudos entre 2003 e o momento, de acordo com o banco de dados *Web of Science*.

O primeiro estudo foi publicado há 20 anos e mostra o potencial da técnica para a análise do óleo essencial de lúpulo [101]. Com o desenvolvimento da GC×GC, diferentes configurações foram descritas, como a cromatografia gasosa bidimensional abrangente paralela (2GC×2GC) [102], e uma variedade de detectores e moduladores. Uma maior capacidade de resolução foi alcançada mais recentemente, com o maior número de compostos relatados por Yan e colaboradores [103], que separaram 306 e identificaram 99 compostos em suas amostras.

Na **Tabela 2.7** é mostrado o preparo da amostra e a configuração das colunas aplicada em cada estudo. Não apenas foram apresentadas análises abrangentes do lúpulo, mas também a detecção de compostos como 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona (4MMP) (IUPAC: 4-metil-4-sulfanilpentan-2-ona (4MSP)). 4MSP é um odorante semelhante a groselha-preta com um limiar de detecção de odor tão baixo quanto 0,00055 µg L⁻¹ em cervejas, e esses estudos exploram a vantagem da grande sensibilidade do sistema GC×GC [104].

Tabela 2.7: Revisão de estudos aplicados a análise de lúpulos por GC×GC

Amostra	Preparo de amostra	Configuração do GC×GC	Colunas	Objetivo estudado	Compostos	Ref.
Cerveja estilo German Pilsner com dry hopping utilizando pellets de lúpulo Eureka dos EUA colhidos em 2016	Cerveja desgaseificada seguida por extração com solvente utilizando éter dietílico, fase orgânica seca e aplicada em agarose mercurosa, com fração de tiol purificada por SAFE	GC×GC–TOFMS, modulador térmico quad-jet de duplo estágio resfriado com nitrogênio líquido	¹ D: DB-FFAP (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ² D: DB-5 (2,0 m x 0,15 mm x 0,30 µm)	Avaliação do efeito do lúpulo Eureka em cervejas no processo de dry hopping	4MMP	[105]
Cerveja estilo Pilsner com dry hopping utilizando pellets de lúpulo Eureka dos EUA colhidos em 2016 em quatro dias diferentes	Cerveja desgaseificada seguida por extração com solvente utilizando éter dietílico, fase orgânica seca e aplicada em agarose mercurosa, com fração de tiol purificada por SAFE	GC×GC–TOFMS, modulador térmico quad-jet de duplo estágio resfriado com nitrogênio líquido	¹ D: DB-FFAP (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ² D: DB-5 (2,0 m x 0,15 mm x 0,30 µm)	Investigação do 4MMP originado do lúpulo durante o processo de dry hopping e seu comportamento ao longo do armazenamento	4MMP	[106]
Cones de lúpulo da Austrália	Destilação por arraste de vapor dos cones para obtenção do óleo essencial e injeção da solução diluída	GC×GC–QMS, modulador LMCS e GC–GC×GC–accTOFMS, modulador LMCS	<u>QMS</u> ¹ D: SupelcoWax10 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ² D: SLB-IL59 or BPX5 (1,4 m x 0,1 mm x 0,08 µm) <u>accTOFMS</u> ¹ D: DB-5 ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ² D: SupelcoWax10 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ³ D: DB-5 (1,4 m x 0,1 mm x 0,08 µm)	Utilização de cromatografia a gás tridimensional híbrida sequencial aplicada em amostras de lúpulo	Sesquiterpenos oxigenados no lúpulo e melhoria na separação desses compostos	[107]
Quatro tipos experimentais de lúpulo da Tasmânia e 4 tipos comerciais: Cascade, Galaxy, Helga e Superpride	Extração dos óleos essenciais por hidrodestilação com o uso de 50 g de lúpulo seco em um aparelho Clevenger	GC×GC–QTOFMS, modulador LMCS	¹ D: Mega-Wax MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ² D: BPX5 (2 m x 0,1 mm x 0,1 µm)	Utilização de GC×GC–QTOFMS para o estudo abrangente dos genótipos presentes em novos tipos de lúpulo	Foram detectados 210-306 compostos únicos, dos quais 99 foram identificados	[103]

Amostra	Preparo de amostra	Configuração do GC×GC	Colunas	Objetivo estudado	Compostos	Ref.
78 amostras de folhas, cones selvagens e pellets de lúpulo	As amostras foram imersas em nitrogênio líquido, moídas em pó, os não voláteis removidos por SAFE e pré-concentração da solução	GC×GC–TOFMS, modulador térmico quad-jet de duplo estágio resfriado com nitrogênio líquido	¹ D: DB-FFAP (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ² D: DB-5 (2,0 m x 0,15 mm x 0,30 µm)	Desenvolvimento de um método analítico para a determinação de 4MSP em lúpulo e produtos de lúpulo	4MSP	[104]
Cones de lúpulo seco	Hidrodestilação dos cones para obtenção de óleo essencial e injeção da solução diluída	2GC×2GC–FID, modulador térmico de dois estágios	<u>Primeiro sistema paralelo</u> ¹ D: BPX5(60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ² D: BP10 (1,2 m x 0,25 mm x 0,25 µm) <u>Segundo sistema paralelo</u> ¹ D: SolGel-Wax (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ² D: SolGel-Wax (1,2 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	Um novo sistema de cromatografia gasosa bidimensional abrangente paralela com aplicação em lúpulo	-	[102]
Cultivares de lúpulo de quatro fazendas na região de Saaz, coletadas entre 2011 e 2014	SPE (sorbente de sílica C18 500 mg) de soluções de lúpulo	GC×GC–TOFMS, criomodulador quad-jet de dois estágios usando nitrogênio líquido	¹ D: DB-WAX (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ² D: DB-5ms (1,6 m x 0,18 mm x 0,18 µm)	Estudo do tempo de colheita e da data de poda nas características aromáticas de chás de lúpulo	63 compostos identificados e 33 compostos quantificados	[108]
Hallertauer Mittelfrüh, Saazer, Tradition, Perle and Cascade	Extração pela mistura de 350 mL de cerveja e 300 g de CH ₂ Cl ₂ , separação da fase orgânica e pré-concentração	GC×GC–TOFMS, criomodulador quad-jet de dois estágios usando nitrogênio líquido	¹ D: Rtx-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) ² D: InartCap 17 (1,6 m x 0,10 mm x 0,1 µm)	Determinação da relação entre compostos-chave derivados do lúpulo e propriedades sensoriais	67 compostos identificados	[109]
Cerveja estilo lager americana com adição de lúpulos fotostáveis	Fibra 85 µm SPME Car/PDMS de 2 cm, para GC×GC– MS– olfatometria e uma barra de agitação de PDMS de 10 mm × 0,5 mm (SBSE) para TOFMS	GC×GC–MS– olfatometria, GC×GC–TOFMS, modulador térmico de dois jatos	¹ D: DB-5 (10 m x 0,18 mm x 0,18 µm) ² D: Rxi-17ms (1,0 m x 0,15 mm x 0,30 µm)	Estudo das mudanças de sabor na cerveja pelo processo de oxidação por GC×GC e olfatometria	7 compostos de relevância olfativa	[110]

Amostra	Preparo de amostra	Configuração do GC×GC	Colunas	Objetivo estudado	Compostos	Ref.
Óleo essencial de lúpulo dos tipos Target e Cascade	Extração de pellets de lúpulo usando CO ₂ líquido e isolamento do óleo essencial por destilação realizada com alto vácuo	GC×GC–FID, GC×GC–TOFMS, modulador LMCS	FID 1D: BPX5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) 2D: BP20 (1,1 m x 0,1 mm x 0,1 µm) TOFMS 1D: BPX5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) 2D: BP20 (0,8 m x 0,1 mm x 0,1 µm)	Desenvolvimento de uma metodologia para a identificação de compostos com impacto odorífero	Álcoois de monoterpenos e sesquiterpenos da fração picante, com 8 picos foram resolvidos em um corte de 18 segundos	[111]
Lúpulos Target, Saaz, Hallertauer Hersbrucker e Cascade	Extração de pellets de lúpulo usando CO ₂ líquido e isolamento do óleo essencial por destilação realizada com alto vácuo	GC×GC–FID e GC×GC–TOFMS, modulador LMCS	FID 1D: BPX5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) 2D: BP20 (1,1 m x 0,1 mm x 0,1 µm) TOFMS 1D: BPX5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) 2D: BP20 (0,8 m x 0,1 mm x 0,1 µm)	Identificação de odorantes presentes na fração picante de óleos essenciais de lúpulo por GC×GC–FID, GC×GC–TOFMS, GC–O e MDGC–O em <i>heart cut</i>	119 regiões de odor ativo e alguns compostos identificados (14-hidroxi-β-cariofileno, geraniol, linalol, β-ionona e eugenol) em uma região	[112]
Óleo essencial de lúpulo do lúpulo Target	Destilação molecular, extrato do pelet a partir de CO ₂ líquido para a fração de óleo e posterior diluição em CH ₂ Cl ₂	GC×GC–TOFMS, modulador térmico com armadilha criogênica	1D: DB-5 (10 m x 0,18 mm x 0,18 µm) 2D: DB17 (1,9 m x 0,1 mm x 0,1 µm)	Uso de GC×GC–TOFMS para separar e identificar compostos em óleos essenciais de lúpulo	Mais de 1000 picos e 119 compostos identificados	[113]
Óleo essencial de lúpulo	-	GC×GC–FID, modulador LMCS	1D: BPX5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) 2D: BP20 (0,8 m x 0,1 mm x 0,1 µm)	Determinação de compostos em óleo essencial de lúpulo por GC×GC	-	[101]

GC×GC – cromatografia gasosa bidimensional abrangente; MS – espectrometria de massas; QMS – quadrupolo MS ; LMCS – sistema criogênico modulado longitudinalmente; accTOFMS – tempo de voo de alta precisão MS; 1D – primeira dimensão; 2D – segunda dimensão; QTOFMS – quadrupolo–tempo de voo MS; 2GC×2GC – cromatografia gasosa bidimensional abrangente paralela; 4MMP – 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona; SAFE – evaporação de sabor assistida por solvente; TOFMS – tempo de voo MS; 4MSP – 4-metil-4-sulfanilpentan-2-ona; SPE – extração em fase sólida; Car – carboxeno; PDMS – polidimetilsiloxano; SPME – microextração em fase sólida; SBSE – extração sortiva por barra de agitação; FID – detector de ionização por chama; O – olfatometria; MDGC- cromatografia a gás multidimensional.

2.4 Suplementação mineral em cervejas

Apesar de a história da cerveja ser longa, apenas nos últimos dois séculos a ciência da cerveja vem sendo desenvolvida, com evolução no campo microbiológico, analítico, de processos, engenharia, sensorial e bioquímico. Essa evolução ainda está em progresso e novas tecnologias se apresentam. Com essa evolução, algumas variáveis no processo fermentativo foram descobertas para otimizar a formação dos metabólitos durante o processo fermentativo [5,35,40].

A literatura apresenta alguns parâmetros de otimização definidos, como altas temperaturas de fermentação podem levar ao aumento de produção de ésteres e álcoois [114], assim como o aumento da gravidade [40] e um aumento na concentração de nutrientes do mosto [114] levam à mesma consequência. Outro resultado que pode ser previsto é a redução de produção de ésteres com aumento de oxigênio na inoculação [115], ou a partir do aumento da maltose no meio [116], ou mesmo pelo aumento de concentração de lipídios no mosto [117].

Além dessas otimizações, a utilização de suplementação com minerais pode ser um recurso na otimização da produção de cervejas. Durante o processo de fermentação, alguns destes íons inorgânicos são essenciais para atividade enzimática e estrutural, sendo potássio, zinco, cálcio e magnésio os mais importantes [35]. Potássio é o constituinte de maior concentração e tem papel de auxiliar o crescimento da levedura e participar na osmoregulação e regulação de cátions divalentes e fosfatos pela levedura [118,119].

O zinco é um micronutriente presente como cofator em enzimas que participam da produção de etanol, além de ser essencial no metabolismo e crescimento de leveduras e na síntese de proteínas [118]. Já cálcio e magnésio têm efeito na redução de pH do mosto, sendo o cálcio importante constituinte no processo de floculação das leveduras, enquanto o magnésio estimula a divisão celular e é um cofator de enzimas [120]. Magnésio também tem a característica de proteger as leveduras dos efeitos nocivos da presença de etanol durante a fermentação, altas temperaturas e estresse osmótico [121].

Estes nutrientes, muitas vezes já estão presentes na água cervejeira e não precisam ser suplementados [21]. Além deles, a literatura reporta diferentes tipos de minerais e sua importância na cerveja e/ou levedura (**Tabela 2.8**), e por muitas vezes

a concentração capaz de estimular leveduras é bem menor que a presente em cervejas.

Tabela 2.8: Minerais inorgânicos e seu efeito em cerveja como macro e micronutrientes.

Ion metálico	Relevância nas funções celulares em leveduras	Concentração em cervejas (mg L ⁻¹) ^a	Concentração para estímulo em <i>S. cerevisiae</i> ^b
<i>Macronutrientes</i>			
K	Osmoregulação, atividade enzimática	46,7-833	2-4 mM
Mg	Atividade enzimática, divisão celular	23,7-266	2-4 mM
<i>Micronutrientes</i>			
Mn	Cofator de enzimas	0,040-0,51	2-4 µM
Ca	Mensageiro secundário, floculação de leveduras	3,8-108	<1 µM
Cu	Pigmentos Redox	0,019-0,80	1,5 µM
Fe	Proteínas Heme, citocromos	0,040-1,55	1-3 µM
Zn	Atividade enzimática, estrutura de proteínas	0,013-1,48	4-8 µM
Ni	Atividade de urease	<0,26	Aprox. 10 µM
Co	Cobalamina (vitamina B12), coenzimas	<0,0008	0,1 µM

^a- Faixa de concentração encontrada em cervejas alemãs; ^b- Concentração relativa ao estímulo de crescimento de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, sendo dependentes da cepa/espécie e as condições do meio.

Fonte: Briggs et al., 2004 [35]; Pohl, 2009 [119]; Walker, 2004 [120].

Outra vantagem do uso de nutrientes minerais é o seu benefício para a saúde humana. A cerveja é uma bebida que já possui características benéficas para a saúde humana e em uma revisão publicada em 2012, Sohrabvandi e colaboradores [122] reportaram diversas vantagens no consumo moderado de cervejas, sendo algumas delas: efeitos antimutagênicos e anticarcinogênicos, efeitos cardioprotetores, estimulação do sistema imune, redução do risco de demência e retardo mental no envelhecimento, prevenção de diabetes, atividade antimicrobiana, facilitação da excreção renal de alumínio, relaxamento e aumento de sociabilidade.

Não diferente de outros alimentos, a cerveja vem apresentando novas formulações para apreciadores da bebida e para quem busca uma alimentação mais saudável ou possui alguma limitação alimentar. Produtos como cerveja com baixo teor de álcool, *low carb* (baixo teor de carboidratos), sem glúten e cervejas funcionais já existem no mercado para atingir pessoas que desejam consumir a bebida, mas tem alguma restrição alimentar.

Uma forma de melhorar a cerveja no aspecto nutricional é a inserção de nutrientes, tanto na escala de macro e micronutrientes. Como legislado e dito

anteriormente, micronutrientes podem ser adicionados em alimentos em concentrações adequadas. Nesse contexto, diversas vitaminas e minerais podem ser aplicados desde que preconizados em conformidade com os órgãos reguladores [123].

No Brasil, a adição de compostos em alimentos e cervejas é legislada pela ANVISA e pelo MAPA e seguem parâmetros que se apresentam em órgãos internacionais como a FAO e WHO. Assim, algumas resoluções são importantes para a adição de minerais e sua classificação. Conforme resolução de 1998, o tipo de alimento é classificado conforme sua porcentagem de IDR (Ingestão diária recomendada), sendo classificado em alimento adicionado de nutrientes (<7,5%), alimento fonte (entre 7,5% e 15%) e de alto teor (>15%) [124]. Já em legislação de 2005 foi atualizado o valor de IDR conforme o grupo ao qual a pessoa se encontra, podendo ser (1) lactante e gestante, (2) lactentes e crianças ou (3) adultos [125]. Por fim, em 2018 regulamentaram-se quais fontes podem ser usadas para fornecer o suplemento daquele composto. Além disso, ainda na legislação de 2018 são expressos limites de uso de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos que podem estar presentes nos suplementos alimentares na recomendação diária de consumo e por grupo populacional indicado pelo fabricante [123].

2.4.1 Selênio

Selênio é um metaloide de número atômico 34 pertencente à família dos calcogênios e um micronutriente essencial na nutrição de seres vivos. Na saúde humana, é um constituinte essencial em selenoproteínas, participando de atividades como metabolismo dos hormônios da tireoide, na reprodução, síntese de DNA, redução do risco de câncer, prevenção de doenças cardiovasculares e proteção contra infecções e danos oxidativos [126]. O selênio pode se apresentar nas formas inorgânicas de selenito (SeO_3^{2-}) e selenato (SeO_4^{2-}) e nas formas orgânicas de selenometionina (SeMet - $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{NO}_2\text{Se}$) e selenocisteína (SeCys - $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{Se}$). As formas inorgânicas são geralmente convertidas nas formas orgânicas por meio da biotransformação por organismos como plantas ou leveduras [127].

Apesar de haver alimentos que possuem este micronutriente com teores superiores aos da recomendação de ingestão diária, a suplementação de cervejas com selênio já foi reportada na literatura [128,129]. Conforme **Tabela 2.9**, é possível

verificar trabalhos da literatura que determinam o teor de selênio em amostras de cerveja e suas matérias-primas, além das diferentes técnicas analíticas aplicadas.

Tabela 2.9: Técnicas analíticas empregadas na determinação da concentração de selênio em amostras de cerveja.

Técnica analítica	Matriz	Compostos	Concentração	Referência
AAS	Cerveja <i>ale</i> (n=54)	Selênio total	0,2-15,2 $\mu\text{g L}^{-1}$	[130]
	Cerveja <i>lager</i> (n=17)	Selênio total	0,2-3,9 $\mu\text{g L}^{-1}$	
MSFIA-HG	Cerveja espanhola (n=8)	Se (IV)	0,24-0,46 $\mu\text{g L}^{-1}$	[131]
-AFS	Cerveja espanhola (n=8)	Se (VI)	0,06-3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Cerveja espanhola (n=8)	Se total	0,47-3,04 $\mu\text{g L}^{-1}$	
ICP-MS	Grão	Se total	111,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$	[132]
	Malte	Se total	128,8 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	Mosto	Se total	30,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
	Cerveja	Se total	12,4 $\mu\text{g kg}^{-1}$	
HPLC-ICP	Cerv. com levedura 52*	SeMetSecys	6 $\mu\text{g L}^{-1}$	[129]
-MS	Cerv. com levedura 52*	SeMet	144 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Levedura 52*	SeMetSecys	741 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Levedura 52*	SeMet	25141 $\mu\text{g L}^{-1}$	
DRC-ICP	Cerv. com levedura 52*	Se total	89 $\mu\text{g L}^{-1}$	[129]
-MS	Levedura 52*	Se total	10870 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Cerv. com levedura 82**	Se total	74 $\mu\text{g L}^{-1}$	
	Levedura 82**	Se total	11908 $\mu\text{g L}^{-1}$	

LC – Cromatografia líquida; AAS – Espectroscopia de absorção atômica; MSFIA-HG-AFS – Análise de vazão por injeção de multiseringas acoplada com espectrometria de fluorescência atômica com gerador de hidretos; ICP-MS - espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado; SeMetSeCys- Selenometilselenocisteína; SeMet – Selenometionina; DRC – Célula de reação dinâmica ;

*levedura 52 – *Saccharomyces cerevisiae* da mata atlântica (Ibirataia - BA) ;

**levedura 82 - *Saccharomyces cerevisiae* da mata atlântica (Jaguaripe - BA).

Em um estudo de 1983, Robberecht, Van Schoor e Deelstra [130] analisaram amostras de cerveja *ale* e *lager* determinando a concentração total de selênio dessas amostras por espectroscopia de absorção atômica (AAS). Notou-se neste estudo que as amostras *ale* possuíam uma faixa mais dispersa de valores de concentração de selênio total, porém não houve diferença significativa entre os grupos, sendo possível confirmar apenas que a fonte desse micronutriente não provinha da água cervejeira.

Em um trabalho recente, Souza e colaboradores (2022) [131] especiaram selênio inorgânico em amostras de cerveja do mercado espanhol. Este trabalho reportou a

presença de Se e não foi verificada diferença clara entre as espécies, onde a média de Se(IV) nas amostras foi de $0,31 \mu\text{g L}^{-1}$ e Se(VI) de $0,57 \mu\text{g L}^{-1}$. Em comparação com o IDR de legislação brasileira ($34 \mu\text{g}$ por dia), as amostras de cerveja possuíam uma faixa entre 0,48 e 3,1% de IDR, os quais são valores baixos e mostram a possibilidade de suplementação da cerveja.

Um comportamento que tem sido alvo de estudos recentes é a biotransformação de Se em espécies orgânicas de Se a partir das leveduras. Trabalhos como o de Ogra et al. (2018) [133], Rodrigo et al. (2014) [132] e Figueirêdo (2017) [129] propõem o uso da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) hifenado a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para determinação das espécies orgânicas de Se em cerveja. Ogra e colaboradores (2018) [133] estudaram a biotransformação em *Saccharomyces cerevisiae* e confirmaram que quatro compostos (SeSug1, SeSug2, SeMet e MeSeCys) são comumente metabolizados em selenometionina pelas leveduras.

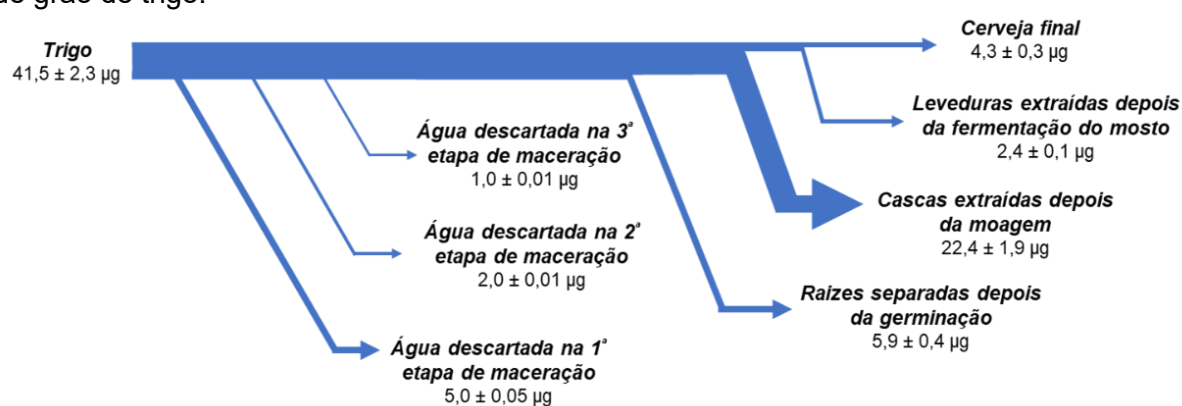
Já em Rodrigo et al. (2014) [132], foi estudada a concentração de Se e suas espécies orgânicas em quatro diferentes etapas da produção de cerveja com grãos de cevada biofortificados com fertilizantes com Se na forma de selenito de sódio e selenato de sódio em doses de 0, 10 e 20 g de Se por hectare. Na **Tabela 2.9** é possível verificar a concentração total de selênio em amostras que não sofreram a biofortificação, sendo possível constatar que a malteação pré-concentra o Se, enquanto nas etapas posteriores ocorrem reduções subsequentes da concentração de Se na amostra.

Quanto à análise das amostras fortificadas, notou-se que o selenato enriquece de forma mais eficiente o grão ($10,15$ vezes maior em 20 g Se ha^{-1}) e a concentração de selênio total na cerveja final é de $73,0 \mu\text{g kg}^{-1}$, sendo significativamente maior que a concentração de $12,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ em cervejas que não usaram grãos biofortificados. Já as espécies orgânicas de SeMet e selenometionina oxidada (SeMetO), e a espécie inorgânica de selenito foram analisadas nas mesmas condições que as outras amostras. No grão sem fortificação, 59% do selenito foi convertido em SeMet, e com aumento dos valores nos grãos fortificados, chegando a 90,4 % de conversão nas amostras em presença de selenato 20 g Se ha^{-1} . Os valores reportados foram reduzindo conforme o processamento da cerveja e no produto já não havia presença de selênio orgânico. SeMetO se mostrou ausente em todas as amostras e no caso da

amostra de cerveja com 20 g Se ha⁻¹, 37% do selênio total provinha de compostos desconhecidos [132].

Rodrigo e colaboradores (2015) [134] realizaram a determinação de ⁷⁷Se em diferentes estilos de cerveja, assim como sua procedência e composição durante o processo de produção de uma cerveja de trigo. As concentrações de selênio quanto ao estilo de cerveja não tiveram uma diferença significativa e apresentaram valores abaixo de 7 µg L⁻¹. Quanto à região de procedência, foi verificado que há diferença entre as 4 regiões (China, Europa + Rússia, América Latina e América do Norte), com maiores concentrações de Selênio sendo encontrada em cervejas canadenses com valores de até 8,06 µg L⁻¹. Quanto ao processo de produção (**Figura 2.12**), foi observado que cerca de 10% do selênio presente no trigo permanece na cerveja final, perda de 5,8% de selênio durante a fermentação e que mais da metade do selênio permanece nas cascas extraídas depois da moagem. Este estudo sugere que a concentração do selênio está ligada ao cereal e a possibilidade de Se no solo do cereal utilizado na confecção da cerveja, assim como a quantidade de ⁷⁷Se no grão mostra-se na forma de ligações Se-proteínas com baixa solubilidade em água e alto peso molecular.

Figura 2.12: Perdas de Se durante o processo de fabricação de cerveja em 250 g de amostra de grão de trigo.



Fonte: Adaptado de Rodrigo et al., 2015 [134]. Licença 5734771182097

Na tese desenvolvida por Figueirêdo (2017) [129] estudou-se o comportamento de leveduras selecionadas para produção de cerveja e aplicação da suplementação de selênio com estudo de Se total por espectrômetro de massas com plasma indutivamente acoplado com célula de reação dinâmica (DRC-ICP-MS) e a determinação de espécies orgânicas por HPLC-ICP-MS. Duas leveduras

Saccharomyces cerevisiae de procedência da mata atlântica (52 e 82) foram aplicadas em cervejas com suplementação de selênio (11 mg L^{-1}) no início da fermentação e determinados Se total, SeMet e selenometilselenocisteína (SeMetSeCys) em levedura e em cerveja. Foi demonstrado que mais que 99% do selênio suplementado se encontrava nas leveduras, demonstrando a capacidade de bioacúmulo pela biomassa, com resultados de Se total similares com as técnicas de DRC-ICP-MS e HPLC-ICP-MS. Quanto a especiação das espécies orgânicas, foi possível confirmar a biotransformação de selenito, majoritariamente em SeMet. O fato de as leveduras sofrerem bioacúmulo ocorre pelo elevado teor proteico da biomassa, tendo importância comercial pelos fatores da possibilidade de reuso da levedura e ao seu uso como suplemento alimentar [135].

Vale ressaltar que para o melhor do nosso conhecimento, não foram encontrados trabalhos que estudaram os efeitos físico-químicos da presença de selênio na cerveja, em sua produção e nas características sensoriais.

2.4.2 Molibdênio

Molibdênio é um metal de transição que em alimentos é considerado como um micronutriente e pode ser benéfico a saúde. Em humanos, o molibdênio auxilia em diversas reações químicas a partir de enzimas. Desta forma, ele tem funções importantes como o metabolismo de ácido úrico, metabolismo de aminoácidos com presença de enxofre, metabolismo de drogas e toxinas, cofator em diversas enzimas e importância na vitamina B12. Sua deficiência pode causar desordens como: tendência de adquirir gota, distúrbios de consciência, distúrbios na produção de vitamina B12 e em razão de falha em metaloenzimas pode levar a doença metabólica rara com retardos mentais [136-138].

O molibdênio tem um papel versátil em reações bioquímicas, catalisando diversas reações redox. Mais de 50 enzimas já foram relatadas como molibdênio-dependentes e com ação em diferentes seres vivos. Estas enzimas, normalmente se apresentam com molibdênio como cofator, também conhecido como MoCo. Em *S. cerevisiae*, molibdênio não se faz presente em enzimas ou na rota bioquímica de MoCo [139].

Ainda em leveduras *S. cerevisiae*, o molibdênio tem função no metabolismo de nitratos em concentração de aproximadamente $1,5 \text{ }\mu\text{M}$, além de ter função no papel da vitamina B12. A concentração de molibdênio em levedura é baixa, com valores na

ordem de $0,7 \text{ mg kg}^{-1}$ em massa seca, podendo variar conforme o tipo de levedura [120]. A distribuição de ^{99}Mo na levedura já foi estudada, com relatos de absorção de cerca de 82,93% do molibdênio pela biomassa. A levedura *S. cerevisiae* apresentou cerca 39,29% de Mo na parede celular, 38,62 % no citoplasma e 19,34% nas organelas, mostrando que a levedura possui molibdênio no modo intracelular [140]. O potencial de sorção de molibdênio pela levedura tem mostrado relevância nos campos de recuperação deste metal assim como nos estudos de biorremediação [141,142].

Em meios ácidos, em condições microbiológicas e químicas favoráveis, o molibdênio pode ser convertido em molibdênio azul, uma espécie com menor toxicidade e de interesse em processos de biorremediação e remoção de molibdênio em excesso e na sua forma tóxica [143].

Não foram encontrados estudos da determinação do teor de molibdênio em cerveja e/ou em seu processo de produção além de seus efeitos nas propriedades sensoriais da bebida. Porém, algumas das matérias primas da cerveja já foram analisadas conforme **Tabela 2.10**. As concentrações são baixas e o maior valor de molibdênio está no lúpulo.

Tabela 2.10: Concentração de molibdênio em matérias primas de cerveja.

Matriz	Compostos	Concentração ^a	Referência
Água de rio	Mo total	$0,42 \mu\text{g L}^{-1}$	[144]
Água corrente	Mo total	$0,5 \mu\text{g L}^{-1}$	[145]
Água de lago	Mo total	$0,19\text{-}0,38 \mu\text{g L}^{-1}$	[146]
Levedura	Mo total	$0,0007 \text{ g kg}^{-1}$	[120]
Lúpulo	Mo total	$0,05 \text{ mg L}^{-1}$	[147]
Cevada	Mo	Traço	[148]
Trigo	Mo	Traço	[148]

a- concentração média relatada.

Em estudo de Bengough e Harris (1955) [149], foi analisada a composição de componentes causadores de turvação na cerveja e foi detectado, dentre outros metais, o efeito da presença de molibdênio como um desses agentes com possível efeito quelante entre as proteínas e o mineral [150]. Para o melhor do nosso conhecimento, não foram encontrados estudos caracterizando efeito desse

micronutriente em outras propriedades da cerveja, trazendo o interesse em seu estudo.

2.4.3 Cromo

Cromo é um metal de transição que se apresenta com maior estabilidade na forma de Cr(III) e Cr(VI). A forma de Cr(III) é um nutriente benéfico para a saúde humana e dentre os seus benefícios, encontram-se a redução do colesterol e a melhora em casos de diabetes do tipo 2. Estas ações estão associadas ao seu papel no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas devido a potencialização da ação da insulina [151-153].

O mecanismo de ação ainda está em estudo, e alguns trabalhos propõem que Cr(III) se liga a oligopeptídeos com formação da cromodulina, composto que promove a ação da insulina a partir da ligação e ativação de seus receptores [152-154]. Algumas outras atuações do Cr(III) tem sido estudadas, assim como a possibilidade de perda de peso [155], melhora na dislipidemia [156], redução do risco de síndrome do ovário policístico [157] e a atividade de antioxidantes [158].

Cromo também pode se apresentar na forma tóxica mais tóxica de Cr(VI), com características prejudiciais à saúde com efeitos carcinogênicos, lesões mutagênicas e causador de dermatites [159,160]. O efeito negativo de Cr(VI) pode se dar, provavelmente, pela interação do íon cromato (CrO_4^{2-}) com peptídeos de função tioálcool dando origem a compostos ligados a CrO_3 levando ao desenvolvimento de câncer por formação de ligações e/ou clivagem de ligações cruzadas DNA-proteína [161].

A concentração de cromo já foi estudada em cervejas e a partir da **Tabela 2.11** tem-se um perfil de análise da determinação de Cr(III) e Cr(VI) em matrizes cervejeiras. Em trabalho de Farri, Gimino e Lagarda (1987) [162], houve uma preocupação em diferenciar o perfil de cromo total durante o processo de produção da cerveja. As concentrações encontradas (**Tabela 2.11**) mostram que a maior concentração de cromo está presente nas matérias primas, principalmente no lúpulo, e que no mosto há uma redução da sua concentração, diminuindo ainda mais na cerveja.

Tabela 2.11: Técnicas analíticas empregadas na determinação da concentração de cromo em amostras de cerveja.

Técnica analítica	Matriz	Compostos	Concentração ^a	Referência
FAAS	Água	Cromo total	0,1 µg kg ⁻¹	[162]
	Malte (n=10)		408 µg kg ⁻¹	
	Levedura (n=5)		425 µg kg ⁻¹	
	Lúpulo (n=10)		761 µg kg ⁻¹	
	Mosto (n=10)		32 µg L ⁻¹	
	Cerveja verde (n=10)		48 µg L ⁻¹	
	Cerveja (n=10)		5 µg L ⁻¹	
GFAAS	Cerveja <i>pale lager</i> (n=24)	Cromo total	3,27 µg L ⁻¹	[163]
	Cerveja <i>pale lager</i> (n=24)	Cr (VI)	0,94 µg L ⁻¹	
	Cerveja Dunkel (n=5)	Cromo total	2,00 µg L ⁻¹	
	Cerveja Dunkel (n=5)	Cr (VI)	< LoQ	
	Cerveja sem álcool (n=14)	Cromo total	4,32 µg L ⁻¹	
	Cerveja sem álcool (n=14)	Cr (VI)	2,51 µg L ⁻¹	
FAAS	Cerveja americana (n=27)	Cromo total	0,34-56 µg L ⁻¹	[164]
	Água		0,50 µg kg ⁻¹	
	Malte		48 µg kg ⁻¹	
	Lúpulo		1163 µg kg ⁻¹	
FAAS	Cerveja <i>ale</i> (n=54)	Cromo total	0,2-25 µg L ⁻¹	[130]
	Cerveja <i>lager</i> (n=17)	Cromo total	0,5-45,9 µg L ⁻¹	[130]
ICP-OES	Cerv. Venezuelanas lata	Cromo total	10-41 µg L ⁻¹	[165]
	Cerv. Venezuelanas garrafa	Cromo total	10-104 µg L ⁻¹	

^a- valores de concentração apresentados como a média aritmética do resultado apresentado no estudo; FAAS - Espectroscopia de absorção atômica com chama; GFAAS - Espectroscopia de absorção atômica com atomização eletrotérmica de forno de grafite; LQ- limite de quantificação; ICP-OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma.

No trabalho de Vieira e colaboradores (2014) [163] foi realizada a análise do perfil de diferentes cervejas com foco na especiação de Cr(VI). A quantificação de cromo total e Cr(VI) ocorreu via absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) e atingiu-se limite de quantificação (LQ) de 0,87 µg L⁻¹ para cromo total e 1,61 µg L⁻¹ para Cr(VI). Setenta amostras de cerveja foram analisadas e adquiridas em Portugal, com a maior parte das amostras com origem local, foram analisadas e diferenciadas quanto à embalagem e aos estilos: *pale lager*, baixo teor de álcool, cerveja frutada, *Dunkel*, *amber lager* e *heller bock*. Dentre as amostras, apenas em nove cervejas foi possível quantificar a presença de Cr(VI), sendo essas cervejas do tipo *pale lager* e de baixo

teor alcoólico. Ainda neste trabalho, foi analisado o consumo diário de cromo total em conformidade com o conselho de alimentação e nutrição da academia nacional de ciências dos EUA, encontrando-se valores de 0,57 a 2,16 $\mu\text{g dia}^{-1}$, representando 2,28-8,64% da recomendação de consumo diário para mulheres e 1,62-6,17% para homens.

Com uma análise da cerveja consumida, Anderson e Bryden (1984) [164] estudaram a concentração, absorção e potencialização do efeito da insulina a partir do consumo de cervejas com cromo. Um total de 27 amostras de cerveja foram analisadas encontrando-se concentrações entre 0,32 e 56 $\mu\text{g L}^{-1}$. Novamente, foi possível verificar que grande parte do cromo advém do lúpulo. Também foi possível confirmar/analisar a atividade de potencialização da insulina a partir das matérias primas e a absorção de cromo em indivíduos a partir da excreção pela urina. Assim, concluiu-se que as análises *in vitro* quanto à potencialização da insulina foi levemente intensificada pelo extrato de malte, inibidos pelo lúpulo e com efeitos insignificantes quanto ao malte, água e adjuntos. Já o consumo de cromo em cerveja por humanos se mostrou similar ao consumo de outros alimentos.

Estudos de tipos de embalagem e cervejas *ale* e *lager* também foram realizados e suas concentrações estão presentes na **Tabela 2.11**. Foi possível verificar concentrações maiores de cromo em cervejas *lager* e embalagens de garrafa, sendo associado ao processamento da cerveja em ambos os casos e não necessariamente ao tipo de cerveja. Essa relação pode estar associada à presença de cromo em ligas metálicas e inox, devido a composição do metal ou pela composição da camada de passivação de superfícies de tanques, sendo que as amostras eram comerciais e não se tinha o conhecimento de como a cerveja foi produzida [35,130,165].

Um dos efeitos que descreve a influência de cromo em cerveja foi reportado no trabalho de Bengough e Harris (1955)[149], onde foi detectada a presença de cromo no material causador da turbidez. Essa presença está associada a precipitação e coagulação juntamente com proteínas. Estudos com a influência em outras propriedades não foram encontrados, provando a importância de estudar tal comportamento.

Capítulo 3. Análise Físico-Química de Cervejas Ale com suplementação de Cromo, Molibdênio e Selênio

3.1 Introdução

A suplementação de cromo, selênio e molibdênio na alimentação possui várias vantagens para a saúde humana, assim como ocorre com a quantidade correta de ingestão desses compostos. Os nutrientes de cromo, na forma de Cr (III), são benéficos para a saúde humana, incluindo a redução do colesterol e melhoria em casos de diabetes tipo 2. Esses benefícios estão associados ao seu papel no metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas devido à potencialização da ação da insulina [151-153].

No caso do molibdênio em humanos, ele auxilia em diversas reações químicas que envolvem enzimas. Dessa forma, desempenha funções importantes, como no metabolismo do ácido úrico, metabolismo de aminoácidos na presença de enxofre, metabolismo de drogas e toxinas, cofator em diversas enzimas e importância na vitamina B12. Sua deficiência pode causar distúrbios, como propensão a adquirir gota, distúrbios de consciência, distúrbios na produção de vitamina B12 e falha em metaloenzimas, o que pode levar a doenças metabólicas raras com retardo mental [136,137]. O molibdênio desempenha um papel versátil em reações bioquímicas, catalisando muitas reações redox. Mais de 50 enzimas são relatadas como dependentes de molibdênio e estão envolvidas em diferentes processos biológicos. Essas enzimas geralmente estão presentes com o molibdênio como cofator. Em *S. cerevisiae*, o molibdênio está ausente em enzimas ou na via bioquímica do MoCo [139].

O selênio é um micronutriente essencial para os seres vivos. Na saúde humana, é um constituinte essencial de selenoproteínas, participando de atividades como o metabolismo de hormônios tireoidianos e sendo importante na reprodução humana, síntese de DNA, redução do risco de câncer, prevenção de doenças cardiovasculares e proteção contra infecções e danos oxidativos [126].

A adição de Cr (III), Mo (VI) e Se (IV) é uma possível maneira de melhorar o valor nutricional da cerveja. No entanto, como há alterações no perfil químico do mosto até a cerveja final, a implementação desses nutrientes poderia afetar o perfil físico-químico da cerveja final, pois esses nutrientes podem ter efeitos sobre a levedura durante a fermentação/maturação do mosto. Portanto, este capítulo tem por objetivo analisar as propriedades físico-químicas de cervejas tipo *ale* suplementadas com esses três nutrientes no mosto para avaliar as diferenças nas cervejas finais.

3.2 Materiais e métodos

3.2.1 Materiais e reagentes

Para os testes físico-químicos foram usados reagentes de padrão analítico ou de maior pureza, sendo eles o 1-butanol (CAS 71-36-3, *Sigma-Aldrich*), etanol (CAS 64-17-5, *Neon*), isopropanol (CAS 67-63-0, *Synth*), metanol (CAS 67-56-1, *Honeywell*), α -naftol (CAS 90-15-3, *Neon*), fenol cristal (CAS 108-95-2, *Nuclear*), iso-octano (CAS 540-84-1, *Dinâmica*), 2,3-butanodiona (CAS 431-03-8, *Sigma-Aldrich*), D-(-)-frutose (CAS 57-48-7, *Neon*), glicose (CAS 50-99-7, *Êxodo científica*), glicina (CAS 56-40-6, *Dinâmica*), ninidrina (CAS 485-47-2, *Merck*), creatina (CAS 6020-87-7, *Health Labs*), fenolftaleína (CAS 77-09-8, *Synth*), ácido sulfúrico (CAS 7664-93-9, *Merck*), ácido clorídrico (CAS 7647-01-0, *Dinâmica*), hidróxido de sódio (CAS 1310-73-2, *Sigma*), hidróxido de potássio (CAS 1310-58-3, *Vetec*), selenito de sódio (CAS 10102-18-8, *Neon*), molibdato de sódio dihidratado (CAS 10102-40-6, *Neon*), cloreto de cromo III hexahidratado (CAS 10060-12-5, *Dinâmica*), fosfato de sódio bibásico (CAS 7558-79-4, *Fmaia*), fosfato de potássio bibásico (CAS 7758-11-4, *Grupo química*), iodo (CAS 7553-56-2, *Synth*), iodeto de potássio (CAS 7681-11-0, *Synth*) e iodato de potássio (CAS 7758-05-6, *Dinâmica*). A água ultrapurificada (18,2 M Ω cm⁻¹ a 25 °C) aplicada durante todo o trabalho foi obtida a partir do equipamento MilliPore Direct-Q ® 3 UV (França).

Soluções estoque de selenito de sódio (Na_2SeO_3), molibdato de sódio ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e cloreto de cromo III ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram produzidas na concentração 1000 mg L^{-1} para os micronutrientes Se(IV), Mo(VI) e Cr(III) e mantidas em refrigerador (cerca de -2°C). Soluções trabalho foram obtidas a partir da diluição das soluções estoque com água deionizada até as respectivas concentrações: 40 mg L^{-1} , 60 mg L^{-1} e 97 mg L^{-1} .

Solução de lugol foi aplicada durante a mosturação e produzida a partir da trituração de iodeto de potássio para posterior diluição em 5 g de iodo e água deionizada até 100 mL.

3.2.2 Produção da Cerveja

Para o processo de produção da cerveja, todos os acessórios foram sanitizados com álcool 70% para evitar contaminação da matriz. No processo de mosturação foi usada cervejeira BrewHome com capacidade de 8 L (Brewbeer, Brasil). Como matéria prima de todas as cervejas, usou-se água mineral com propriedades conforme **Anexo A** (Crystal, Brasil) e levedura comercial T-58 (SafAle, Bélgica). Com objetivo de sanitizar o equipamento, manteve-se água mineral a 100°C por 1 hora com seu posterior descarte.

Para o procedimento exploratório aplicou-se a formulação de cerveja conforme Lara (2018) [166]. Foram diluídos 450 mL de malte líquido IPA (Muntons Reino Unido) em 4 L de água mineral com mistura e posterior adição na cervejeira. A mistura foi levada para a fervura até atingir a temperatura de 100°C . Ao início da fervura foram adicionados 2,0 g de lúpulo Zeus em *pellets* da marca *Barth Haas* (LNF Latino-Americana, EUA) e manteve-se a temperatura de 100°C por 60 min. Após isso, foi realizado o *whirlpool* por aproximadamente 15 min e resfriou-se o mosto até temperatura de 30 a 40°C . O *whirlpool* consiste no uso de uma espátula com a formação de um redemoinho no líquido para deposição do *trub* no centro da panela. A massa de levedura foi determinada conforme o rótulo e pesou-se 1,61 g com sua ativação seguida de adição e agitação com objetivo de homogeneizar e aerar o mosto. Por fim, este mosto foi levado para fermentação, conforme o planejamento de fermentação (3.2.3.1).

Já para a matriz de cerveja *ale* final fez-se necessário o processo de brassagem do malte. Para a moagem dos grãos de malte, foi usado um moinho de rolos de aço

galvanizado modelo ALCF. Foi usada uma mistura de 1,25 kg de malte Pilsen premium, 125 g de malte Vienna e 50 g de malte aromático Castle. Para a brassagem, 6 L de água mineral foram levados para aquecimento e quando a temperatura atingiu 64 °C foi então inserida a mistura malte moída e manteve-se desta forma por 80 min. Durante a mosturação, com o objetivo de confirmar a conversão do amido em açúcares foi realizado o teste com iodo a partir da solução de lugol. Este teste tem por princípio a oclusão do iodo pelas amiloses presentes no interior da hélice de amido e formação de um complexo iodo-amido de coloração azul. Desta forma, quando não houve formação da coloração azul, prosseguiu-se para a etapa de filtração.

Da mesma forma que a etapa anterior, a mistura foi levada para fervura a temperatura de 100 °C e quando esta temperatura foi atingida, 13,75 g de lúpulo em *pellets* US Golding T90 (USA) foram adicionados e a temperatura foi mantida desta forma por 60 min. Aos 5 min finais da fervura, foram adicionados 75 g de açúcar. Com a fervura finalizada, realizou-se o *whirlpool*, seguido de resfriamento com serpentina e bombeamento de água gelada. Foi mensurado o valor de gravidade original (O.G.) e iniciou-se a etapa de fermentação, com a adição de 1,5 g de levedura, que foi previamente ativada e adicionada em 2,5 L do mosto produzido (3.2.3.2). O restante do mosto foi levado para o congelador e mantido para futuras fermentações.

3.2.3 Planejamento de fermentação

Os recipientes de fermentação usados foram frascos reagente de vidro borosilicato 3.3 de 250 mL (Laborglass, Brasil) e em cada frasco foram fermentados 150 mL de cerveja. Todas as fermentações ocorreram a temperatura de 20 °C em frigobar com controlador de temperatura e com agitação manual diária.

3.2.3.1 Cerveja *Blond ale* com malte líquido

Os experimentos de fermentação ocorreram com o objetivo de verificar o perfil de mudanças no caráter físico-químico em presença de selênio na concentração de 41,25 µg L⁻¹ (12,13 % de IDR). Amostras controle também foram fermentadas e em ambos os casos foram analisados o perfil de pH (3.2.4.1), etanol (3.2.4.2), cor (3.2.4.3), amargor (3.2.4.4), carboidratos totais (3.2.4.5), acidez total (3.2.4.7) e FAN (3.2.4.11). Os fermentadores foram mantidos em ambiente controlado com os frascos tampados com pano especial para impedir a entrada de oxigênio e permitir apenas a

eliminação de dióxido de carbono. Cada frasco foi mantido com a cerveja fermentando até o momento específico relativo ao tempo estudado com a amostra armazenada em congelador até o momento da análise. Os tempos estudados foram: 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 168 h e 216 h.

3.2.3.2 Cerveja *Blond ale* com brassagem do malte

A produção das cervejas finais foi planejada para se estudar o perfil físico-químico das matrizes após o processo de maturação (3.2.4). As amostras fermentadas seguiram a legislação com três concentrações diferentes de cada micronutriente (Cr, Mo e Se): cerveja adicionada de nutriente (7,5% de IDR), cerveja fonte de nutriente (12,5% de IDR) e cerveja com alto teor de nutriente (17,5% de IDR), conforme **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1: Níveis de concentração de micronutrientes e nível de IDR aplicado no planejamento de fermentação.

Código	Micronutriente	% IDR	Concentração de micronutriente (µg/100 mL)
Cont	Amostra controle	0	0,000
Cr7,5	Cromo	7,5	2,625
Cr12,5	Cromo	12,5	4,375
Cr17,5	Cromo	17,5	6,125
Mo7,5	Molibdênio	7,5	3,375
Mo12,5	Molibdênio	12,5	5,625
Mo17,5	Molibdênio	17,5	7,875
Se7,5	Selênio	7,5	2,550
Se12,5	Selênio	12,5	4,250
Se17,5	Selênio	17,5	5,950

Os fermentadores foram alocados em sistema de *blow off* adaptado (**Figura 3.1**), onde o sistema foi vedado com tampa de silicone e a saída do gás ocorreu por uma mangueira transparente de 1/8" até um tubo cônico do tipo Falcon (15 mL) preenchido com água e álcool.

A fermentação ocorreu por um período de 96 h seguido do aumento de 1 °C por dia até 25 °C em frigobar com controlador de temperatura. As amostras foram então mantidas a 0 °C até o momento de análise. Todas as amostras foram desgaseificadas com objetivo de reduzir a interferência causada pelo CO₂.

Figura 3.1: Sistema de fermentação aplicado nas matrizes estudadas.



3.2.4 Caracterização da cerveja

3.2.4.1 Determinação do pH

Para medição de pH, utilizou-se um peagâmetro digital marca JKI, modelo JK-PHM-005 (Shangai, China) com calibração de equipamento com soluções tampão de pH 4,00 e 7,00. Para medição dos valores obtidos, amostras foram analisadas de modo aleatório até estabilização do valor de pH.

3.2.4.2 Graduação alcoólica

A graduação alcoólica ou teor de etanol da cerveja foi determinado via método cromatográfico *dilute and shot* desenvolvido pelo nosso grupo [167]. Para este método, amostras de cerveja foram diluídas 10 vezes em solução aquosa de padrão interno 1-butanol (I.S.) na proporção 50 μL de cerveja e 450 μL de I.S. na concentração de 1% v/v seguido de homogeneização em vórtex (Velp Scientifica, Itália). Foi utilizado um cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama (GC-FID) Shimadzu® GC-17A (Japão) e coluna PoraPLOT Q (10 m x 0,32 mm x 10 μm). Hidrogênio foi usado como gás de arraste em vazão de 2,3 $\text{cm}^3 \text{min}^{-1}$, separação isotérmica com temperatura de 200 °C e injetor e detector a temperatura de 250 °C. O volume de injeção foi de 0,2 μL com razão de split de 1:2 e tempo de corrida foi de 4 min.

3.2.4.3 Cor

A coloração foi determinada conforme metodologia da ASBC [46] (Beer 10 ASBC). Amostras de cerveja foram diluídas 10 vezes na proporção de 0,5 mL de cerveja e 4,5 mL de água deionizada. As amostras foram então analisadas em espectrofotômetro digital na região do visível da marca Kasuaki, modelo IL-226-NM-BI (China) no comprimento de onda de 430 nm em cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm.

Para cálculo de valores de EBC e SRM foram usadas as equações a seguir

$$Cor (EBC) = 25.Abs_{430} \quad (3.1)$$

$$Cor (SRM) = 12,7.D.Abs_{430} \quad (3.2)$$

Onde Abs_{430} é a absorbância obtida em cada medição em 430 nm, D é o fator de diluição da amostra e 12,7 é o fator de correção de meia polegada para o sistema SRM. Para esta metodologia o branco utilizado foi água deionizada.

3.2.4.4 Amargor

Amargor também foi determinado conforme regulamenta a ASBC [46] (Beer 23 ASBC). O procedimento consistiu na adição de 2,5 mL de amostra em tubo cônico do tipo Falcon de 15 mL, seguido da adição de 125 µL de solução de HCl a concentração de 6 mol L⁻¹ e 5,0 mL de isooctano, seguido de agitação por 20 min em agitador mecânico rotativo (Kacil Indústria e comércio Ltda). Após a agitação, as amostras foram levadas para centrifugação a 3000 RPM por 5 min em uma centrifuga da marca Centribio, modelo 80-2B.

Com as fases já separadas, a parte superior (fase orgânica) foi transferida para uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 10 mm. E desta forma foi lida a absorbância de cada amostra em comprimento de onda 275 nm em espectrofotômetro UV-Vis modelo Cary 60 (Agilent). Após a medição, o amargor, medido em IBU foi calculado conforme equação abaixo.

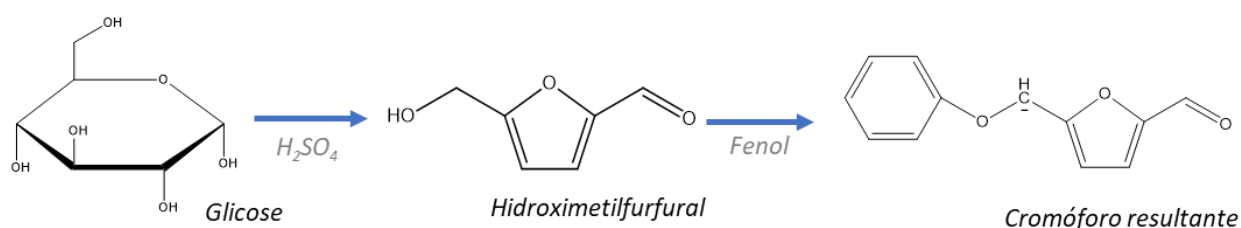
$$Amargor (IBU) = 50.Abs_{275} \quad (3.3)$$

Para este procedimento, os valores de amargor levaram em conta o valor obtido para o branco de procedimento com aplicação do mesmo processo de extração em água deionizada.

3.2.4.5 Carboidratos totais

Conforme método Beer-41a ASBC [46], o método fenol-sulfúrico [168] foi aqui aplicado. O princípio deste método é a realização de uma reação colorimétrica, onde açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados com grupos redutores livres irão sofrer uma desidratação com o ácido sulfúrico e em presença de fenol, ocorrerá a formação de coloração laranja conforme exemplo com a glicose (**Figura 3.2**).

Figura 3.2: Equação química da reação fenol-sulfúrico empregada para determinação de carboidratos totais.



As amostras foram diluídas 1000 vezes em água destilada e alíquotas de 2,0 mL desta solução foram vertidas em tubos cônicos do tipo Falcon de 15 mL. Um volume de 1,0 mL de solução aquosa fenol 5 % m/v foi pipetado no frasco e houve agitação em vórtex a 3000 rpm por 5 s. Em seguida, houve a adição de 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (P.A.).

Ao término da adição do ácido, o tubo foi fechado e levado para agitação por 15 s a 2000 rpm. Subsequentemente, a solução foi levada para repouso com objetivo de os carboidratos reagirem e ocorrer a formação de cor. Esse repouso ocorreu com os tubos em temperatura ambiente por 10 min, seguido de resfriamento em banho de água a temperatura ambiente por 20 min. Logo após, mediu-se a absorbância em 490 nm em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico e espectrofotômetro digital na região do visível da marca Kasuaki, modelo IL-226-NM-BI (China). Água deionizada foi usada como branco de leitura, e houve a aplicação de branco de reagente, em que o procedimento foi realizado com o uso de 2,0 mL de água deionizada no lugar da solução de cerveja diluída. Glicose 2% m/v foi usada como padrão, realizando a mesma reação fenol-sulfúrico usando 2,0 mL dessa solução. O teor de carboidratos é calculado em g/100 mL de amostra via **Equação 3.4**.

$$\text{Carb. (g/100 mL)} = \frac{0,9 \cdot (Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \cdot 2 \cdot \text{Fator de diluição}}{(Abs_{padrão} - Abs_{branco})} \quad (3.4)$$

3.2.4.6 Dicetonas vicinais (VDK)

Dicetonas vicinais (VDK) foram determinadas via reação colorimétrica e quantificação por espectrofotômetro no visível (Beer 25 ASBC [46]). Este método quantifica o VDK total, com a inclusão do precursor e dos dois VDKs encontrados em cerveja (2,3-butanodiona e 2,3-pentanodiona). A determinação ocorre com a oxidação em presença de base forte (KOH) em exposição ao oxigênio atmosférico e com a formação de coloração rosada.

As amostras foram destiladas por destilação simples onde 40 mL de cerveja foram misturadas com 3 gotas de agente antiespumante (Simeticona 75 mg mL⁻¹) com o objetivo de reduzir o borbulhamento da solução. O destilado foi direcionado para um tubo cônico do tipo Falcon de 15 mL com a presença de 1,0 mL de água destilada até a obtenção de 8,0 mL de solução.

A solução foi completada com água destilada até se obter 10 mL. Desta solução, foram retiradas alíquotas de 3,0 mL para reação com 600 µL de solução de α -naftol (4% m/v em isopropanol) e 300 µL de solução de creatina-KOH. A solução de creatina-KOH foi produzida a partir da diluição de 0,1875 g de creatina em balão volumétrico de 50 mL e preenchido com solução aquosa de KOH 40 % m/v.

Esperou-se a reação ocorrer por 5 min e foi realizada a medição da absorbância em 530 nm em cubeta de quartzo e espectrofotômetro UV-Vis modelo Cary 60 (Agilent, EUA) com água destilada como branco. A quantificação ocorreu por curva de calibração com soluções de 2,3-butanediona nas concentrações de (1) 0,05 mg L⁻¹, (2) 0,1 mg L⁻¹, (3) 0,2 mg L⁻¹, (4) 0,3 mg L⁻¹, (5) 0,6 mg L⁻¹ e (6) 0,8 mg L⁻¹ conforme determina a metodologia da ASBC.

3.2.4.7 Acidez total

A acidez total foi determinada por titulação com base forte (Beer 8 ASBC [46]). Para a análise exploratória (3.2.3.1), a determinação da acidez ocorreu primariamente com a cerveja diluída 10 vezes em frasco Erlenmeyer com fenolftaleína como indicador. A base forte usada foi NaOH 0,1 mol L⁻¹ em bureta de 10 mL. As titulações nesta etapa ocorreram em duplicata e o volume de titulante foi determinado quando o ponto de viragem foi atingido pela formação de coloração rosada.

Nas cervejas finais (3.2.3.2) foi realizada titulação por condutometria em um medidor de condutividade AK51-V4 da marca AKSO (Brasil). A titulação ocorreu em béquer com a diluição de 5 mL de amostra em 15 mL de água deionizada. Para esta

etapa aplicou-se solução NaOH 1,96 mol L⁻¹ com adições de alíquotas de 50 µL a cada etapa. O volume de titulante foi determinado pela interseção das duas retas formadas durante a curva de titulação.

A acidez total mede a quantidade de ácidos totais presentes em amostra, sendo medida em miliequivalente de ácido por litro de amostra. Assim, a concentração de ácidos totais foi determinada conforme **Equação 3.5**.

$$Acidez\ total\ (mEq/L) = \frac{1000 \cdot V_{NaOH} \cdot C_{NaOH}}{V_{cerveja}} \quad (3.5)$$

3.2.4.8 Acidez fixa

Já a acidez fixa determina a presença de ácidos em cerveja desconsiderando a presença dos ácidos voláteis. Sua determinação ocorreu com o processo de evaporação da amostra até a secura e ressuspensão da parte sólida com 20 mL de água deionizada. A titulação ocorreu do mesmo modo que para acidez total (3.2.4.7) das cervejas finais e a quantificação foi determinada a partir da **Equação 3.6**.

$$Acidez\ fixa\ (mEq/L) = \frac{1000 \cdot V_{NaOH} \cdot C_{NaOH}}{V_{cerveja}} \quad (3.6)$$

3.2.4.9 Acidez volátil

A determinação da acidez volátil caracteriza os ácidos orgânicos voláteis produzidos durante a fermentação. Este parâmetro foi obtido pela subtração da acidez total (3.2.4.7) pela acidez fixa (3.2.4.8) (**Equação 3.7**).

$$Acidez\ volátil\ (mEq/L) = Acidez\ total\ (mEq/L) - Acidez\ fixa\ \left(\frac{mEq}{L}\right) \quad (3.7)$$

3.2.4.10 Leveduras (OD)

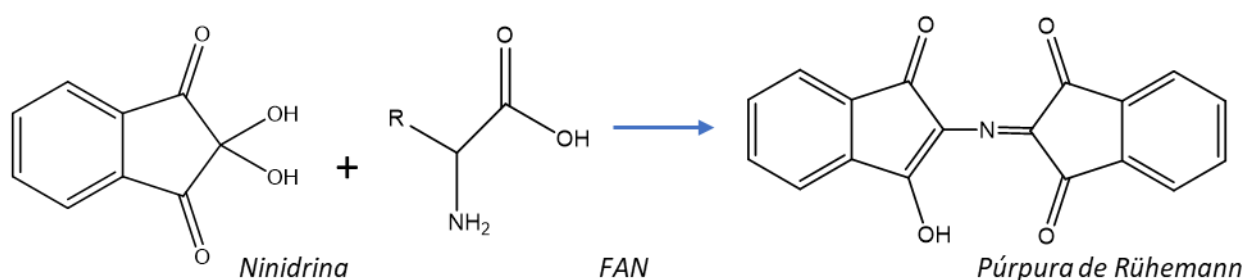
A análise de leveduras ocorreu via determinação por densidade ótica (OD) [169]. A medição ocorreu em comprimento de onda de 600 nm em cubeta de quartzo de 10 mm de caminho ótico e espectrofotômetro na região do visível da marca Kasuaki, modelo IL-226-NM-BI (China) e foi realizada uma comparação direta destes valores.

3.2.4.11 Amino nitrogênio livre (FAN)

A quantificação do teor de amino nitrogênio livre (FAN) em cerveja ou mosto é uma metodologia aplicada para determinar a quantia destes analitos que estão na amostra e disponíveis para a levedura durante a fermentação ou ao seu término. Esse método determina os aminoácidos, amônia e grupos com terminação α -amino nitrogênio em proteínas e peptídeos.

Este método tem duas normativas na lista da ASBC: Beer 31 e Wort 12 [46]. Estas normativas são complementares, já que a determinação do teor de nitrogênio amino livre em cerveja segue o mesmo método aplicado no mosto cervejeiro. Para a determinação de FAN, foi usada a reação com ninidrina (**Figura 3.3**).

Figura 3.3: Equação química da reação para determinação de Amino Nitrogênio livre pelo uso de ninidrina.



Esta etapa ocorreu com o uso de amostras diluídas 100 vezes e com o uso de solução de glicina 2 mg L^{-1} como padrão de amino nitrogênio. A solução de ninidrina foi produzida com 2 g de Na_2HPO_4 , 3 g de KH_2PO_4 , 0,25 g de ninidrina e 0,15 g de frutose em balão volumétrico de 50 mL completando-se com água destilada, seguido de ajuste de pH para valores entre 6,6 e 6,8. Também foi preparada solução de diluição, onde 0,5 g de KIO_3 foi solubilizado em 100 mL de etanol 96% v/v em balão volumétrico de 250 mL foi completado com água destilada.

As reações ocorreram em tubo cônico do tipo Falcon (15 mL) com alíquotas de 2,0 mL de amostra diluída e adição de 1 mL de solução de ninidrina. Os tubos foram levados para banho-maria por 16 min com frascos fechados para evitar evaporação, seguido de banho em água à temperatura ambiente por 20 min. Após isso, 5 mL de solução de diluição foi adicionada e agitada em vórtex com medição de absorbância em 570 nm em espectrofotômetro na região do visível com cubeta de quartzo de caminho ótico de 10 mm. Também foi realizado o mesmo procedimento para o padrão e o branco, em que foram substituídos os 2 mL de amostra diluída por, respectivamente, 2 mL de solução de glicina 2 mg L^{-1} e água destilada.

A quantificação de ninidrina ocorreu via **Equação 3.8**.

$$FAN (mg/L) = \frac{Abs_{solução}}{Abs_{glicina}} \cdot C_{glicina} \cdot \text{Fator de diluição} \quad (3.8)$$

Onde $Abs_{solução}$ é a absorbância obtida pelas amostras e corrigida com o branco de procedimento, $Abs_{glicina}$ é a absorbância do padrão de glicina corrigida com o branco de procedimento e $C_{glicina}$ é a concentração da solução padrão em $mg L^{-1}$.

3.2.4.12 Extratos

Foram realizadas as análises de extrato original, extrato real e extrato aparente das amostras [46,47]. O extrato original (OE) é determinado no mosto cervejeiro a partir da gravidade original (OG), enquanto o extrato aparente (AE) é determinado pela concentração de sólidos diluídos na cerveja final considerando a presença de álcool e o extrato real (RE) não considera a presença de álcool. A OG foi determinada por uso de um densímetro com escala entre 1,000 e 1,060 em proveta de 100 mL e determinação de temperatura com termômetro digital tipo espeto. A partir deste valor foi encontrado o valor de OE conforme **Equação 3.9**.

$$OE(^{\circ}P) = 135,997.OG^3 - 630,272.OG^2 + 1111,140.OG - 616,868 \quad (3.9)$$

Para determinação de AE e RE, a graduação alcoólica foi convertida de ABV para concentração em m/m ($A_{m/m}$) conforme:

$$A_{m/m}(\%) = ABV.0,8 \quad (3.10)$$

Assim, com a **Equação 3.10** e **3.11**, chegou-se ao cálculo de AE aplicado (**Equação 3.12**).

$$A_{m/m}(\%) = (3,72.10^{-1} + 3,57.10^{-3}.OE).(OE - AE) \quad (3.11)$$

$$AE(^{\circ}P) = \frac{(3,57 \times 10^{-3}.OE^2 + 3,72.10^{-1}.OE - A_{m/m})}{(3,57.10^{-3}.OE + 3,72.10^{-1})} \quad (3.12)$$

Com todos os valores encontrados, foi calculado o valor de RE (**Equação 3.13**)

$$\begin{aligned} RE(^{\circ}P) = & 0,4968.A_{m/m} + 1,002.AE - 5,911.10^{-4}.\frac{A_{m/m}^2}{m} - 2,943.10^{-4}.AE^2 - 8,475.10^{-3}.\frac{A_{m/m}^2}{m} \\ & + 1,836.10^{-4}.\frac{A_{m/m}^3}{m} + 1,115.10^{-5}.AE^3 \\ & + 2,452.10^{-6}.\frac{A_{m/m}^2}{m}.AE^2 \end{aligned} \quad (3.13)$$

Também foram determinados o grau de fermentação aparente (ADF) e o grau de fermentação real (RDF), respectivamente pelas **Equações 3.14** e **3.15**.

$$ADF = 100 \cdot \frac{OE - AE}{OE} \quad (3.14)$$

$$RDF = \left(100 \cdot \frac{OE - RE}{OE} \right) \left(\frac{1}{1 - 0,005161 \cdot RE} \right) \quad (3.15)$$

3.2.5 Análise estatística dos dados

Para análise estatística dos dados foram usados os programas Excel® (Microsoft, EUA), Past versão 4.06b (University of Oslo, Noruega) e MATLAB® versão 7.13 (MathWorks, EUA) juntamente com o PLS toolbox versão 6.7.1 (Eingenvector Technologies, EUA). Foram realizados testes de normalidade (Teste David), homoscedasticidade (Cochran e Barlett), retirada de *ouliers* (Dixon) e Anova de um fator seguida de teste Tukey, todos a 95% de confiança. Também foram feitos teste de correlação de Pearson e testes quimiométricos por análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica de clusters (HCA).

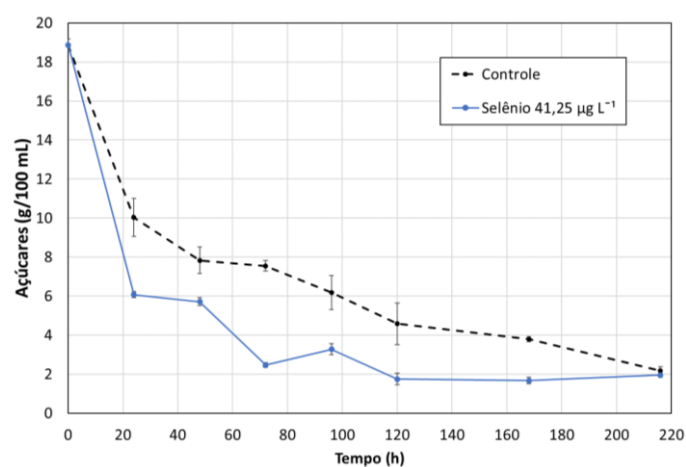
3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Testes exploratórios

Os experimentos foram desenvolvidos conforme item 3.2.3.1 com tempo de fermentação de até 216 h e concentração de 41,25 µg L⁻¹ de Se. Perfis cinéticos de carboidratos totais, etanol, pH, acidez total e FAN foram analisados. Também foram determinados os perfis de amargor e cor das amostras.

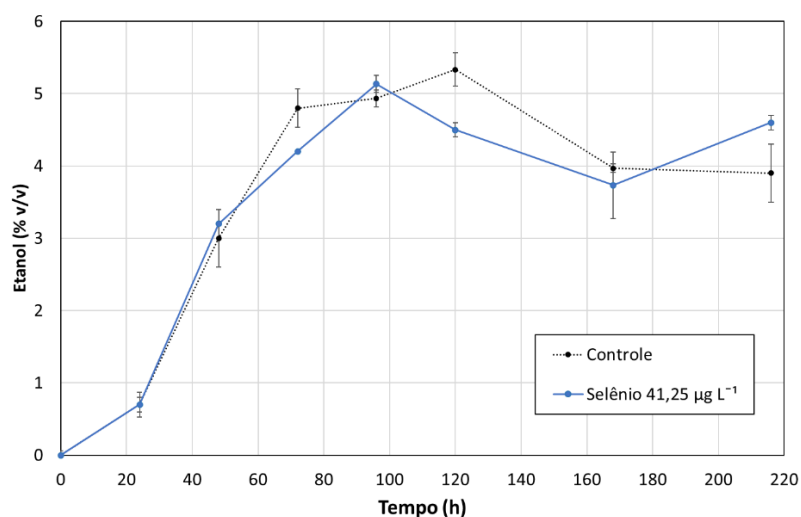
Iniciando-se pelos açúcares, o perfil de consumo desta matéria prima está expressa na **Figura 3.4**. Este experimento apresentou algumas características interessantes, sendo uma delas, o consumo de açúcares em amostras com presença de selênio ocorre de forma mais rápida do que nas amostras controle. O maior consumo de açúcares ocorreu nas primeiras 24 h, com consumo de 67,76% em amostras com presença de selênio frente a 46,81% das amostras controle. A partir do quinto dia (120 h), nota-se um perfil estável de açúcares para as cervejas com selênio e as amostras controle tem uma menor taxa de consumo de carboidratos. Por fim, a concentração de carboidrato atinge valores similares em 216 h, assim, o uso de selênio pode acelerar o consumo de carboidratos, reduzindo o tempo de fermentação pela metade.

Figura 3.4: Perfil cinético de consumo de carboidratos totais em cervejas *blond ale* (n=3 e desvio padrão) com extrato de malte líquido e em presença do micronutriente selênio 41,25 $\mu\text{g L}^{-1}$.



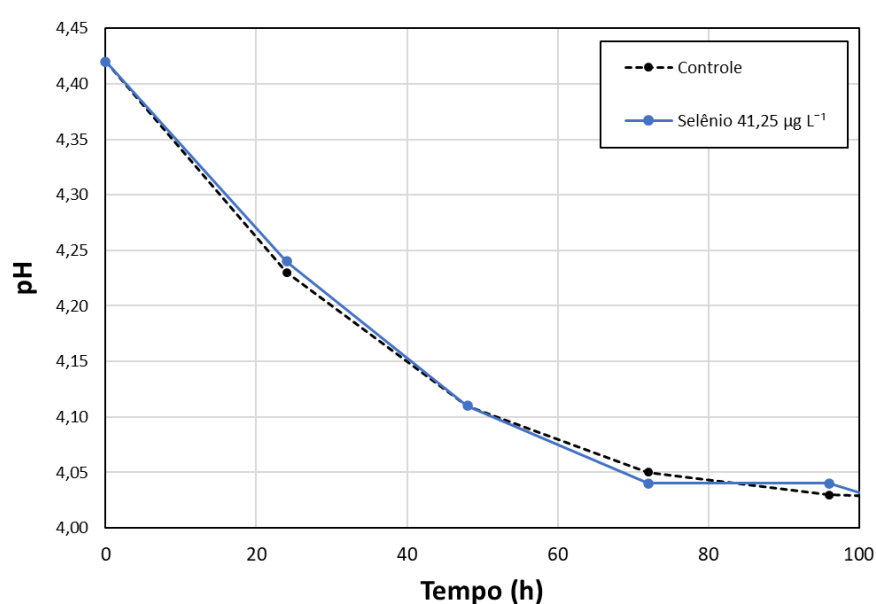
O perfil de etanol, expresso em % v/v, foi obtido na **Figura 3.5** Nas amostras com presença de selênio, foi possível verificar que o valor máximo de etanol é atingido em 96 h de fermentação, superando o valor máximo das amostras controles neste momento. Para as amostras controle, em 72 h o teor alcoólico atingiu cerca de 5% v/v com pequenas mudanças até seu valor máximo em 120 h. Desta forma, nota-se que em 96 h a fermentação havia acabado nas amostras com Se e há uma redução no teor alcoólico após esse momento. Essa redução pode ter ocorrido pelo fato do formato do fermentador ter causado a volatilização de alguns álcoois. Para garantia de que essa volatilização não fosse um fator a prejudicar os experimentos futuros, um sistema de *blow off* foi desenvolvido para aplicações pós testes preliminares. Assim, optou-se por analisar amostras com até 96 h de fermentação nos estudos preliminares.

Figura 3.5: Perfil cinético de produção de etanol em cervejas *blond ale* (n=3) com extrato de malte líquido e em presença de micronutriente selênio 41,25 $\mu\text{g L}^{-1}$.



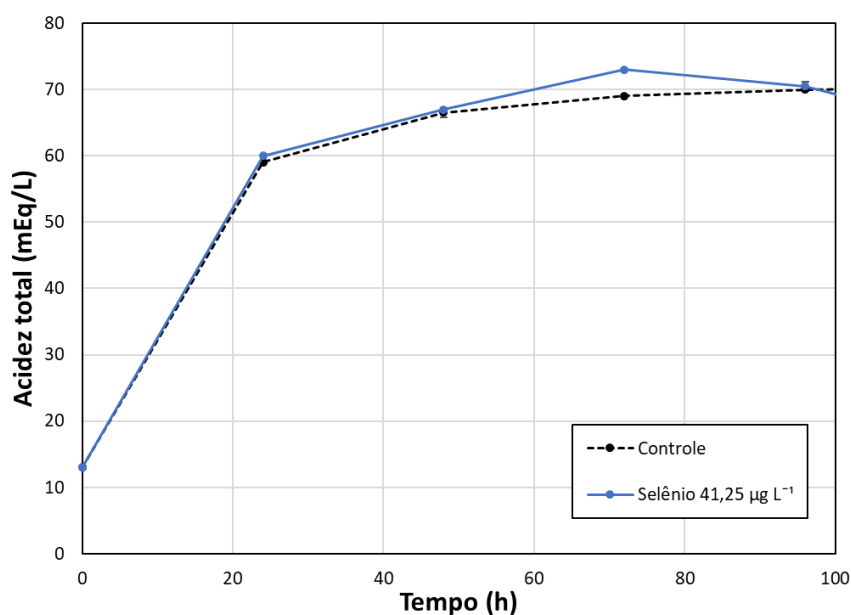
Não houve diferença significativa entre o pH das amostras controle e em presença de selênio (**Figura 3.6**). O perfil de pH obtido está em conformidade com os relatos da literatura, uma vez que o processo fermentativo induz a acidificação das amostras de cerveja, com pH próximo a 4. Em estudo de Costa e colaboradores (2019) [170] em cerveja do estilo *Blond ale*, o pH das amostras tiveram valor médio de 3,90 e foram muito próximos dos valores obtidos neste estudo.

Figura 3.6: Mudança de pH em cervejas *blond ale* com extrato de malte líquido e em presença de micronutriente selênio 41,25 $\mu\text{g L}^{-1}$ durante o processo fermentativo.



Para verificar os compostos ácidos, a titulação com base forte (NaOH) foi aplicada com o uso de fenolftaleína como indicador. A mudança no perfil de ácidos totais tituláveis foi obtida conforme **Figura 3.7**, onde é possível verificar um perfil similar entre amostras controle e em presença de selênio. Uma das dificuldades desse processo, foi o ponto de viragem das titulações, já que a cerveja era escura, optando-se pelo uso de titulação condutimétrica nos estudos na seção 3.3.2, além de poder realizar a determinação de acidez volátil e fixa. As duplicatas se mostraram similares, com pequeno valor de desvio padrão. Em 72 horas, a acidez total da cerveja com selênio exibiu seu valor máximo (73 mEq L^{-1}) diferindo da amostra controle. Esse comportamento pode ser justificado com o maior teor alcoólico das amostras controle neste momento (**Figura 3.5**). E assim como no teor alcoólico, as amostras ficaram similares em 96 h com valor médio de cerca de 70,5 mEq L^{-1} . Este valor mostra que a cerveja está mais ácida que cervejas *pale ale* (entre 19,07 e 46,02 mEq L^{-1}) podendo ser característica do mosto aplicado na receita [171].

Figura 3.7: Mudança de acidez total (mEq L^{-1}) em cervejas *blond ale* com extrato de malte líquido e em presença de micronutriente selênio $41,25 \mu\text{g L}^{-1}$ durante o processo fermentativo.



Os parâmetros cor e amargor foram medidos tanto no mosto quanto ao fim do processo fermentativo (**Figura 3.8**). As cores, expressas pela unidade EBC, mostram tonalidades muito escuras de cerveja, em que é possível verificar esta escala de cor na **Figura 3.9**. Esta cor não é normal pra cervejas *blond ale* (aproximadamente 8 EBC com cor amarelo ou ouro), mas essa característica é explicada pela produção do mosto com o extrato de malte, dando cores mais escuras para a cerveja [171]. Como alternativa para as etapas posteriores, o extrato de malte foi substituído por malte em grãos e a etapa de moagem do grão foi inserida dentro do processo de produção do mosto. As cores das cervejas ao fim da fermentação foram menores do que a do mosto, característica essa explicada pela clarificação do meio dentro da etapa de fermentação. Assim como o amargor reduziu os valores de IBU nas ao fim da fermentação, podendo os iso-alfa-ácidos estarem presentes no precipitado proteico ao fim da fermentação. Tanto cor quanto amargor não apresentaram mudanças significativas entre as amostras controle e em presença de selênio.

Figura 3.8: Cor e amargor no mosto e em cervejas *blond ale* (n=3) com extrato de malte líquido e em presença de micronutriente selênio 41,25 µg L⁻¹.

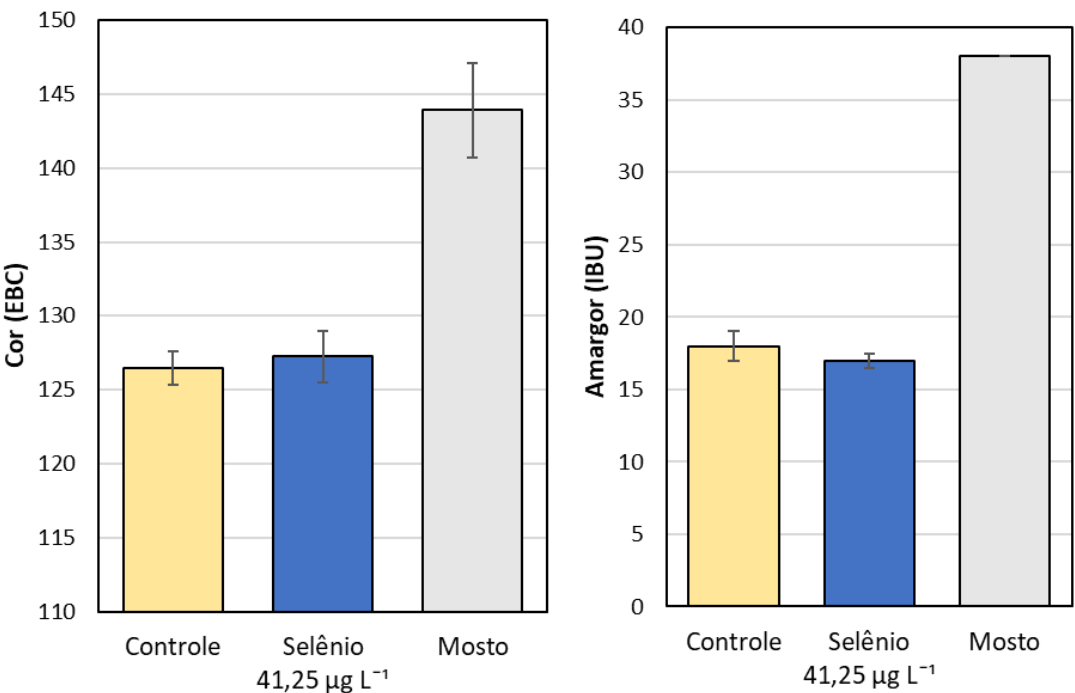


Figura 3.9: Escala de cores SRM e EBC em cervejas, e exemplos de sua coloração em amostras reais.

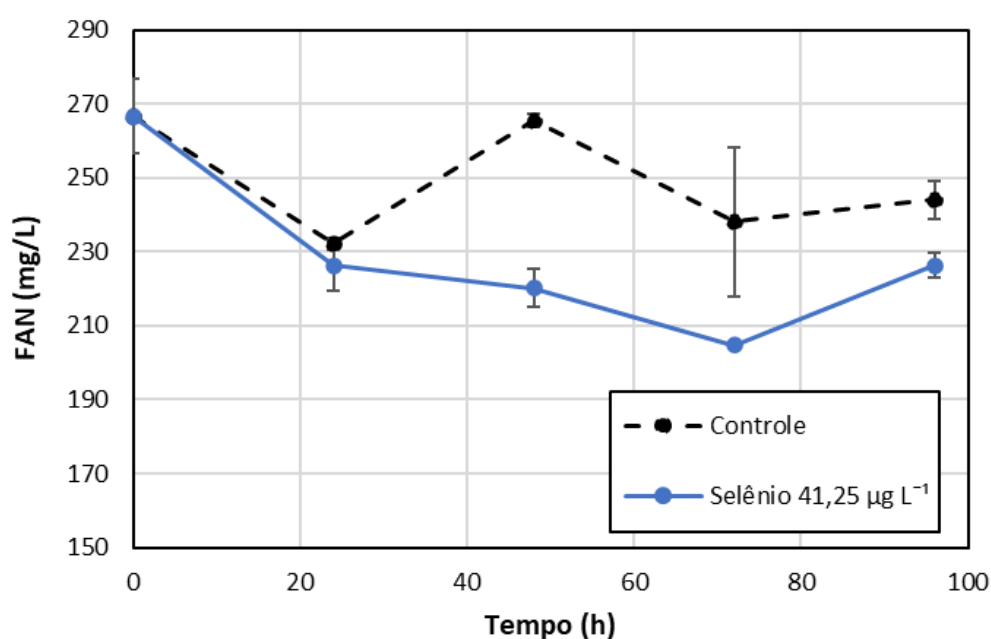


Fonte: Adaptado de Barros e Ghesti, 2016[172] e Foltinek, 2020 [173]

Por fim, o último parâmetro analisado nos testes exploratórios foi a mudança no perfil de FAN nas amostras de cerveja (**Figura 3.10**). Pelo perfil apresentado, nota-se que o mosto possui suplementos nitrogenados para a levedura, sem ser necessário fazer a suplementação do mosto. Além disso, verifica-se também o perfil de consumo deste suplemento em ambas as cervejas, com maior consumo em cervejas com adição de selênio. Este consumo é essencial para a rota de *Ehrlich* com consumo de

aminoácidos e formação de álcoois superiores, o que pode também justificar a maior presença de ácidos tituláveis (ex.: cetoácidos) em 72 h nas amostras com selênio. Nota-se por fim que o maior consumo de FAN acontece nas primeiras 24 h e que ao fim das 96 h, a concentração de FAN é de 244 mg L⁻¹ para amostras controle e de 226 mg L⁻¹ para amostras em presença de selênio.

Figura 3.10: Perfil de FAN em cervejas *blond ale* (n=3) com extrato de malte líquido e em presença de micronutriente selênio 41,25 µg L⁻¹ durante o processo fermentativo.



3.3.2 Análises físico-químicas nas cervejas suplementadas

A escolha da matriz foi determinada para produção de uma cerveja de forma simples onde a produção do mosto ocorresse com fácil reprodutibilidade. Já a adição de micronutrientes foi determinada conforme preconizado pela ANVISA, onde foram usados os reagentes permitidos em concentrações baseadas no IDR e valores abaixo do limite máximo estabelecido nas legislações (**Tabela 3.2**).

Tabela 3.2: Valores de IDR e limites máximos para cada micronutriente conforme as legislações vigentes no Brasil e a respectiva identificação do composto (CAS).

Elemento	CAS	IDR adulto (µg)	Lim Máx (µg)
Selênio	10102-18-8	34	319,75
Molibdênio	10102-40-6	45	1955
Cromo	10060-12-5	35	250

Desta forma, uma análise de consumo máximo de cada matriz também foi realizada especificando o limite de cada nutriente em alimentos conforme apresentado pela **Tabela 3.3**. Estes valores apresentam a limitação de consumo diário de cada matriz, com cálculos baseados em valores preconizados e o percentual de micronutrientes em IDR (%) presentes em cada 100 mL de cerveja [124] demonstrando que seria necessário um alto consumo de cerveja para atingir o limite de cada nutriente.

Tabela 3.3: Volume máximo de consumo diário das cervejas suplementadas baseado nos limites máximos de adição dos nutrientes conforme legislação brasileira.

Nutriente	Consumo máximo (L)		
	7,5%	12,5%	17,5%
Selênio	12,54	7,52	5,37
Molibdênio	57,93	34,76	24,83
Cromo	9,52	5,71	4,08

Tendo em vista esta análise, aqui nas próximas partes serão explicadas as análises físico-químicas.

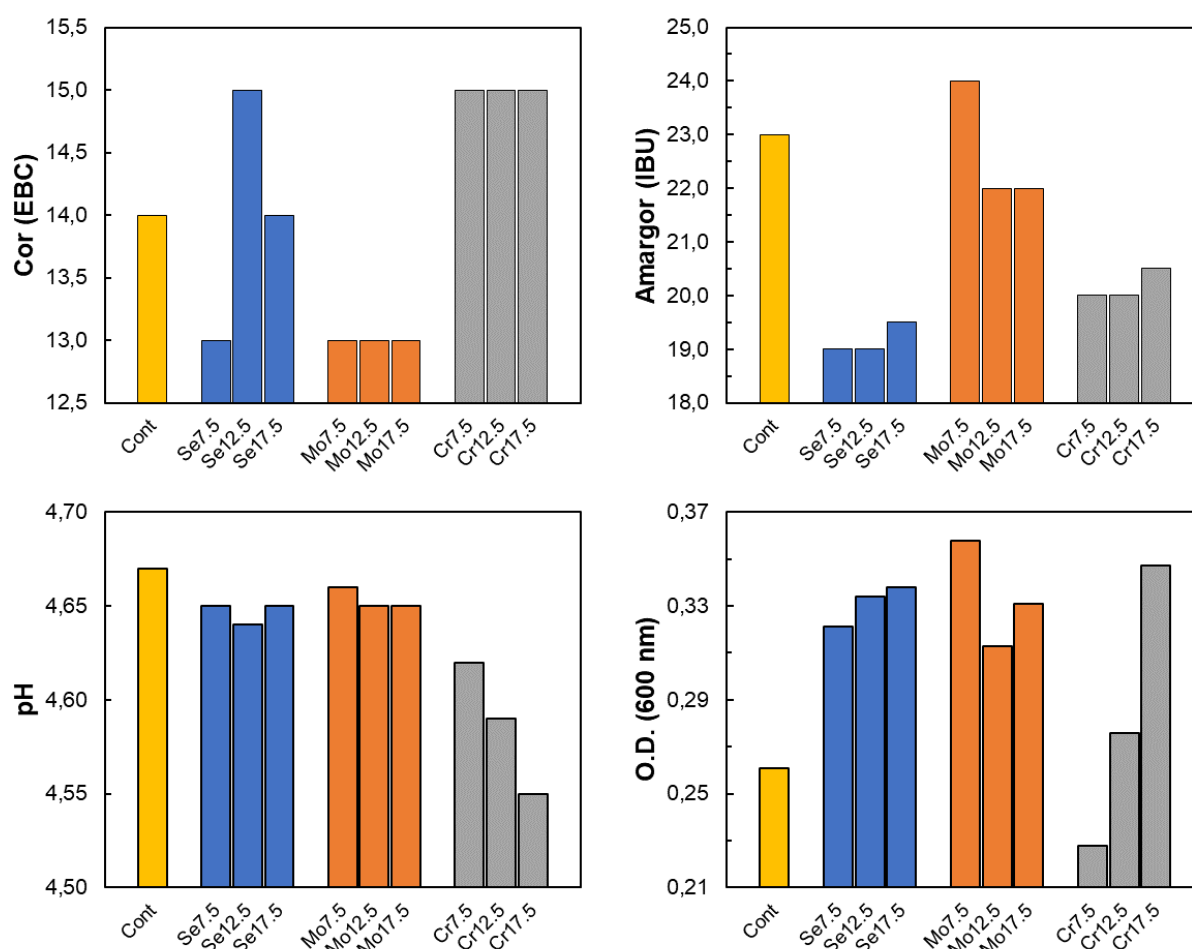
3.3.2.1 Cor, amargor, pH e densidade ótica

Os resultados dos parâmetros cor, amargor e densidade ótica das leveduras foram obtidos como apresentados na **Figura 3.11**.

Para cor, as amostras estão representadas pelas escalas EBC e SRM. Estas escalas se apresentam de forma discreta com valores inteiros. Os valores são muito próximos em todas as amostras com valores entre 13 e 15 EBC.

Quanto ao amargor, é importante ressaltar que a apresentação de seus valores é dada em intervalos de 0,5 e quanto maior o valor de IBU mais amarga é a cerveja e maior a concentração de iso-alfa-ácidos. Desta forma é possível verificar que as amostras com presença de selênio possuem os menores valores de IBU e quando comparado com a amostra controle essa diferença chega a ser de 4 IBUs. As amostras com presença de cromo também apresentaram valores menores de amargor do que a amostra controle, mas com diferença máxima de 3 IBUs. Por fim, as amostras de molibdênio ficaram com valores próximos ao da cerveja controle. Assim, pode ser notado que a adição de cromo e selênio afetam no amargor da cerveja, deixando a bebida com menor concentração de iso-alfa-ácidos.

Figura 3.11: Cor, amargor, pH e densidade ótica em cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.



O pH das amostras com adição de micronutrientes foi menor do que a amostra controle. As amostras com adição de molibdênio e selênio apresentaram valores próximos entre si enquanto as amostras com presença de cromo possuíram os menores valores de pH. Nota-se também que com o aumento da concentração de cromo, menor se torna o pH da cerveja ao fim do processo. Estes valores são normais para cervejas *ale* que apresentam pH em uma faixa de 3,0 e 6,0 e são caracterizados pela presença de ácidos produzidos durante a fermentação com redução do pH da água cervejeira pela presença de ácidos orgânicos e pela carbonatação do meio [174].

Já a densidade ótica medida em 600 nm, representa quantidades de leveduras, onde maiores valores mostram um maior número de leveduras no meio. Os resultados mostram que as amostras com adição de selênio e molibdênio possuem maior concentração de leveduras em relação a amostra controle. Para as amostras com adição de cromo, nota-se que quanto maior a adição deste nutriente maior foi a

densidade ótica, com valores superiores ao da amostra controle em valores superiores a 12,5% de IDR.

3.3.2.2 Etanol e carboidratos

As amostras foram analisadas quanto ao seu substrato principal (carboidratos) e seu metabólito principal (etanol). Os dados obtidos foram estatisticamente tratados (Apêndice C – **Tabela A.2** a **Tabela A.7**) com remoção de outliers conforme teste de Dixon, considerados normais via teste de David, homocedásticos a partir dos testes de Cochran (mesmo número de replicatas) e Bartlett (dados de tamanhos diferentes após a remoção de outliers). A partir disso, os dados foram analisados por Anova seguida de teste de Tukey. Com estes testes, a **Figura 3.12** foi construída e valores médios foram apresentados com a mesma letra na mesma coluna quando não diferiram significativamente.

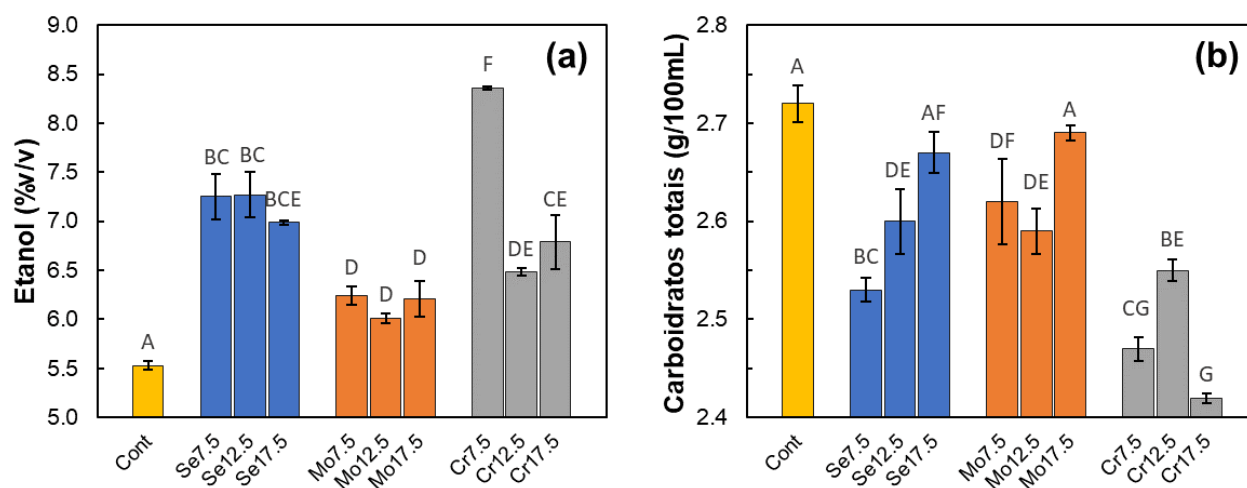
Pelos valores de etanol, pode se perceber que a presença dos micronutrientes aumentou a produção de etanol em todas as cervejas. O maior valor apresentado foi para a amostra com adição de 7,5% de IDR de cromo (1,5 vezes maior). O acréscimo de selênio nos valores de 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR proporcionaram respectivamente, o terceiro, o segundo e o quarto maior valor de concentração de etanol, sugerindo que a adição de nutrientes de selênio em diferentes concentrações tem aumento de até 30% na concentração de etanol quando em comparação com as amostras controle. As amostras também se apresentaram dentro das conformidades da legislação brasileira, estando entre 0,5% e 54% de etanol [1].

Pelo teste de Tukey, os resultados mostraram significativa diferença entre os micronutrientes. A cerveja Cr7,5 apresentou comportamento diferente das outras amostras com adição de cromo e apresentando o maior teor alcóolico dentre as amostras. Também é possível verificar que não houve diferença significativa dentre as amostras com adição de molibdênio e selênio.

Já pelos valores de carboidratos totais, nota-se como foi o perfil de consumo de açúcares. Quanto menor o valor de carboidratos, maior o consumo pela levedura e maior a produção de metabólitos. De modo geral, todas as amostras com adição de micronutrientes apresentaram maior consumo de açúcares do que a amostra controle. As amostras com presença de cromo e a amostra Se7,5 foram as amostras com maior consumo de açúcares, sugerindo que a presença de cromo pode influenciar no aumento do consumo de açúcares. Apesar da amostra Se7,5 ter consumido uma

quantidade considerável de açúcares, é possível verificar que com o aumento da concentração de selênio no meio, menor foi o consumo de carboidratos.

Figura 3.12: Concentração de etanol (a) e carboidratos totais (b) em cervejas *blond ale* (n=3) com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.



Valores médios com a mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.3.2.3 Extratos

O extrato original (OE) foi determinado a partir da densidade do mosto antes de ser levado para a fermentação (OG) encontrando-se o valor de $1,044 \text{ g cm}^{-3}$. Este valor sofreu a correção a partir da temperatura (27°C) assumindo o valor de $1,052 \text{ g cm}^{-3}$ e conforme **Equação 3.9** (p.63) o valor de OE foi de $12,77^\circ \text{P}$. A partir deste valor e com os dados da **Figura 3.12** foi possível realizar os cálculos de AE, RE, ADF e RDF com as **Equações 3.10 a 3.15**, encontrando-se os valores dispostos na **Tabela 3.4**.

Para a cerveja *Blond ale* era esperado valores de OG próximo a $1,067 \text{ g cm}^{-3}$ [84], sendo o OG encontrado um pouco menor do que o esperado, mas de acordo com cervejas *Blond ale*. Pela legislação brasileira, a OE está dentro da conformidade já que o valor mínimo esperado seria de 5% m/m, e o valor obtido de $12,77^\circ \text{P}$ representa valor de $12,77 \text{ g}$ de açúcares em 100 g de mosto [1]. Pela classificação da legislação estas cervejas são consideradas como cervejas extra, já que possuem valores entre 12 e 14% m/m. Como é possível verificar pela **Tabela 3.4**, alguns valores de AE e RE se mostraram negativos. O valor negativo não tem um sentido químico, já que representaria que o consumo de extratos foi superior ao que estava presente na

amostra. Os valores de ADF e RDF apresentaram os graus de fermentação, sendo possível confirmar que o grau de fermentação real (RDF) é menor que o grau de fermentação aparente (ADF). A comparação entre resultados mostra que as cervejas com adição de minerais tiveram melhor comportamento no grau de fermentação e apresentaram maiores valores de extrato, ou seja, maior presença de açúcares. De modo geral, devido aos valores negativos de AE e RE, além da OG não apresentar o valor esperado, estes experimentos precisam ser reavaliados para se obter uma análise correta dos dados com a medição da densidade ao fim da fermentação.

Tabela 3.4: Extrato real, extrato aparente, grau aparente de fermentação e grau real de fermentação em cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.

Amostra	AE (°P)	RE (°P)	ADF (%)	RDF (%)
Cont	2,16	4,21	83,05	68,51
Se7,5	-1,11	1,52	108,72	88,80
Se12,5	-1,16	1,48	109,11	89,11
Se17,5	-0,62	1,92	104,87	85,78
Mo7,5	0,82	3,11	93,56	76,87
Mo12,5	1,25	3,46	90,19	74,19
Mo17,5	0,87	3,15	93,18	76,57
Cr7,5	-3,16	-0,17	124,77	101,27
Cr12,5	-0,06	2,39	100,46	82,32
Cr17,5	-0,24	2,23	101,91	83,46

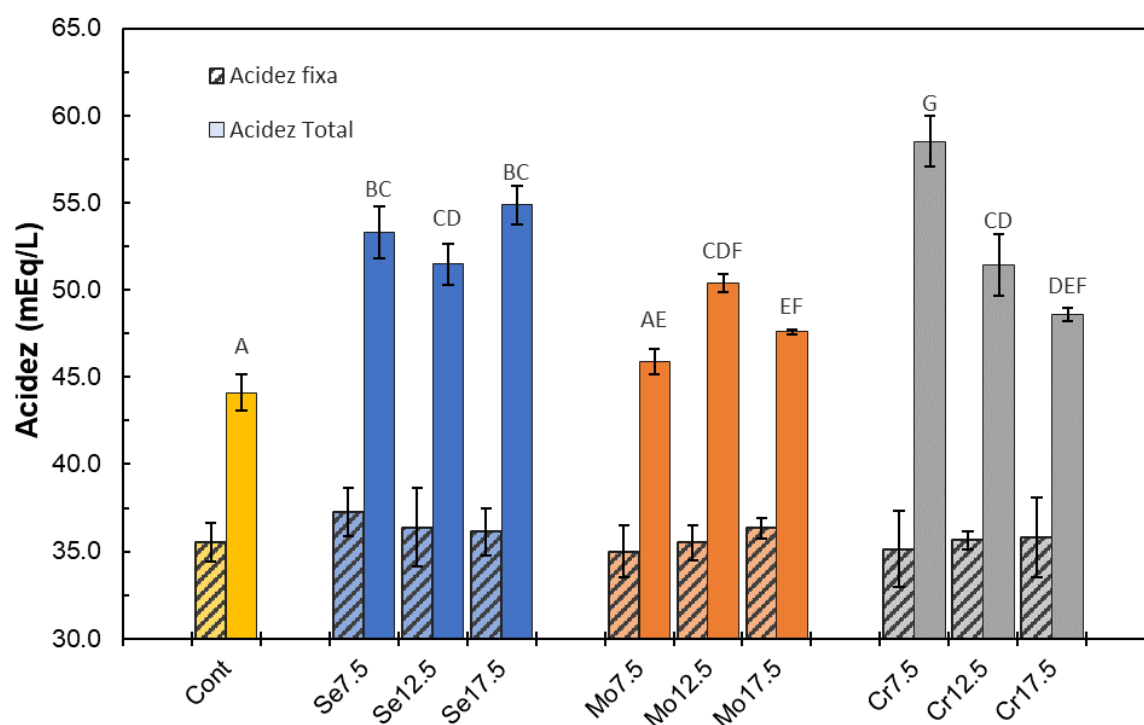
AE – Extrato aparente; RE – Extrato real; ADF – Grau aparente de fermentação; RDF- Grau real de fermentação.

3.3.2.4 Acidez total, fixa e volátil

A acidez das cervejas foi determinada quanto a presença de todos os ácidos tituláveis, assim como os ácidos orgânicos voláteis e aos ácidos não voláteis (fixos). Os dados obtidos foram estatisticamente tratados (Apêndice C – **Tabela A.8** a **Tabela A.13**) com remoção de outliers conforme teste de Dixon, considerados normais via teste de David, homocedásticos a partir dos testes de Cochran (mesmo número de replicatas) e Bartlett (dados de tamanhos diferentes após a remoção de *outliers*). A partir disso, os dados foram analisados por Anova seguida de teste de Tukey. Com estes testes, a **Figura 3.13:** foi construída e valores médios foram apresentados com a mesma letra na mesma coluna quando não diferiram significativamente.

A partir dos resultados encontrados é possível verificar que o maior contribuinte da acidez total é a acidez fixa, representando valores de 60,05 a 80,54% da composição dos ácidos tituláveis. Porém, pela Anova foi possível verificar que a acidez fixa não possui diferença estatística entre as médias. Esse resultado faz sentido, uma vez que a acidez fixa retrata os ácidos que já estavam presentes no mosto e foram advindos das matérias primas [175]. Como os ácidos totais são um somatório dos ácidos metabolizados pelas leveduras, ácido acético, ácido carbônico (equilíbrio de CO₂ com água) e outros ácidos tituláveis [35], é possível verificar que o efeito dos nutrientes ocorreu a partir dos ácidos voláteis, ou seja, pela influência dos metabolitos excretados na fermentação.

Figura 3.13: Acidez total, fixa e volátil em cervejas *blond ale* (n=3) com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.



Valores médios com a mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

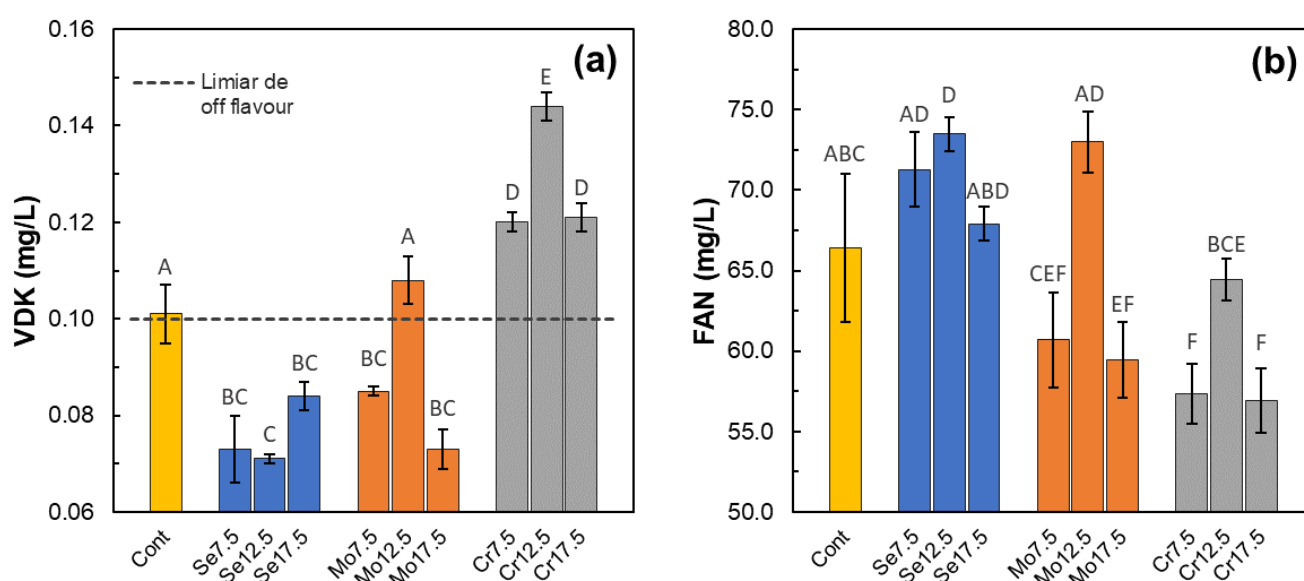
Os valores de acidez total das amostras mostram que a cerveja é menos ácida do que em comparação aos testes exploratórios (aproximadamente 70 mEq L⁻¹). Isso corrobora com o fato de ter sido usado um mosto diferente. Quando comparado com a literatura, os valores são um pouco maiores do que cervejas *pale ale* (entre 19,07 e 46,02 mEq L⁻¹) [171], mas por ser um estilo diferente este valor não difere muito do valor encontrado.

Comparando-se os resultados encontrados, as cervejas com adição de micronutrientes apresentaram maior concentração de ácidos voláteis, onde a amostra controle apresentou o menor valor de acidez total e acidez volátil. A amostra Cr7,5 foi a amostra que apresentou maior produção de ácidos voláteis, porém com base nos resultados encontrados não foi possível verificar outros parâmetros que diferenciaram os micronutrientes aplicados.

3.3.2.5 VDK e FAN

Estes testes têm por princípio analisar a formação de *off flavour* VDK assim como analisar os materiais nitrogenados ao fim do processo de fermentação na forma de FAN. Os dados obtidos foram estatisticamente tratados (Apêndice C – **Tabela A.14** a **Tabela A.19**) com remoção de outliers conforme teste de Dixon, considerados normais via teste de David, homocedásticos a partir dos testes de Cochran (mesmo número de replicatas) e Bartlett (dados de tamanhos diferentes após a remoção de *outliers*). A partir disso, os dados foram analisados por Anova seguida de teste de Tukey. Com estes testes, **Figura 3.14** foi construída e valores médios foram apresentados com a mesma letra na mesma coluna quando não diferiram significativamente.

Figura 3.14: Dicetonas vicinais (a) e amino nitrogênio livre (b) em cervejas *blond ale* (n=3) com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.



DP – Desvio padrão; CV – Coeficiente de variação. Valores médios na mesma coluna com a mesma letra não diferem significativamente, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

O limite de percepção sensorial negativo de VDK é quando sua concentração assume valores superiores a $0,100 \text{ mg L}^{-1}$ [40]. As amostras com adição de cromo excederam esse valor, enquanto a amostra controle ficou no limiar da percepção sensorial. Com exceção da cerveja Mo12,5, as amostras com adição de molibdênio e selênio tiveram resultados positivos, uma vez que essas amostras têm concentração de VDK menor que a amostra controle e estão abaixo da percepção negativa deste *off flavour*.

Os valores obtidos para FAN foram menores que os valores obtidos nas amostras de testes exploratórios. Novamente, isto está relacionado ao tipo de mosto, sendo que os mostos aplicados foram diferentes. Da mesma forma que os carboidratos, quanto menor o valor apresentado maior foi o consumo de FAN no processo fermentativo. Desta forma, as amostras com adição de cromo tiveram o maior consumo de FAN dentre todas as outras amostras. Por outro lado, as amostras com adição de selênio consumiram menos FAN quando comparadas com a amostra controle.

3.3.3 Análises estatísticas

Para melhorar a interpretação dos dados, análises estatísticas uni e multivariadas foram aplicadas. As matrizes de correlação foram construídas conforme **Figura 3.15**.

Diversas correlações com valores superiores a 0,85 foram encontradas tanto de forma positiva quanto de forma negativa. Assim foram encontradas 20 correlações para o selênio, 8 correlações para o cromo e 7 para o molibdênio. Pelo alto número de correlações, algumas delas serão discutidas. Em todos os casos, houve alta correlação positiva entre acidez total e acidez volátil, caracterizando assim que o aumento da acidez nas amostras está interligado aos ácidos orgânicos voláteis presentes nas cervejas como foi discutido no item 3.3.2.4.

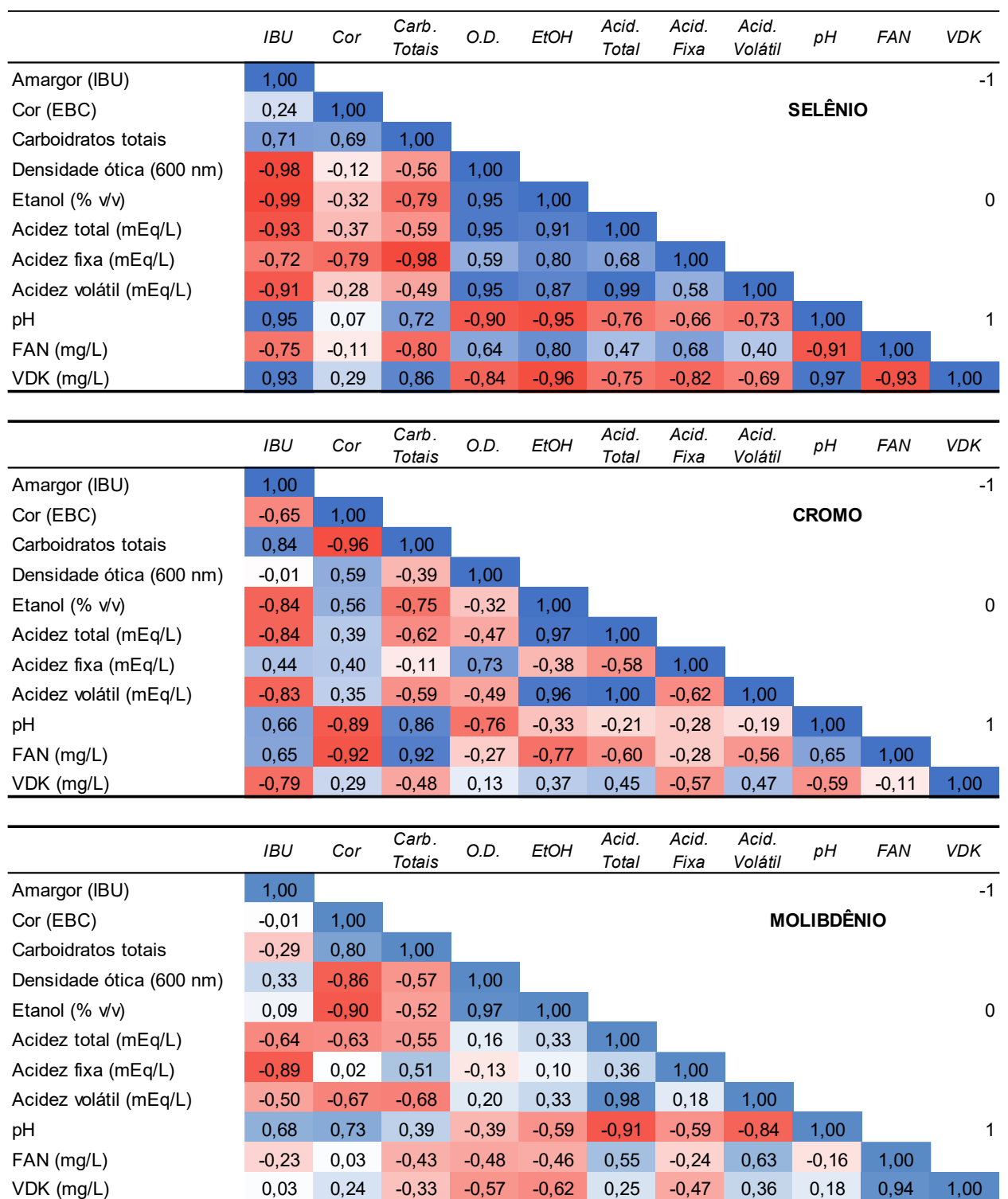
Para as correlações de selênio, altas correlações negativas foram encontradas para o amargor, sendo elas: densidade ótica, etanol, acidez total e acidez volátil. Isso mostra que o uso de selênio trará efeito no amargor da cerveja, como uma possível consequência do aumento da densidade ótica e aumento do teor alcoólico. Selênio também tem alta correlação entre densidade ótica com etanol e acidez total, indicando que há uma relação do número de leveduras e aumento na produção de metabólitos. Como há mais correlações positivas há efeitos sinérgicos. Com o aumento da produção de ácidos, correlações negativas com o pH foram encontradas tanto para

etanol quanto OD, caracterizando um meio mais ácido com um menor valor de pH e número de leveduras. Como amargor é dado pela concentração de iso-alfa-ácidos nota-se uma correlação positiva com o pH. O bioacúmulo de selênio [135] pode ter uma influência com a presença de selênio em levedura, uma vez que é possível que isso provoque o aumento das leveduras, com produção de etanol e ácidos orgânicos.

Para cromo, nota-se a mesma correlação positiva entre etanol e acidez total que por consequência tem relação com acidez volátil, ou seja, a produção destes metabolitos se relaciona positivamente. Notaram-se também as correlações positivas entre os substratos carboidratos totais e FAN e carboidratos totais e pH. Como há mais correlações negativas há efeitos antagônicos. Essas relações poderiam ser explicadas pelo consumo da fonte de carbono tendo relação direta com a alteração de pH. Uma característica interessante verificada na adição do micronutriente de cromo foi a correlação negativa entre a cor da cerveja com três outros parâmetros físico-químicos: carboidratos, pH e FAN. Assim, juntamente com as correlações de carboidrato, acredita-se que existe uma influência dos substratos juntamente com o cromo para mudança da coloração da cerveja como uma possível causa de presença com o relato de presença de cromo no material causador da turbidez estudado por Bengough e Harris (1955)[149]. Vale ressaltar que as cervejas com cromo ficaram um pouco mais escuras que as outras cervejas (**Figura 3.12**, p.94), mas com diferença máxima de 2 EBC, caracterizando pouca mudança na escala de cor (**Figura 3.9**, p.89).

Já o micronutriente molibdênio foi o que possuiu o menor número de altas correlações. Foram 3 correlações positivas: (1) OD e Etanol; (2) Acidez total e volátil e (3) FAN e dicetonas, e 4 correlações negativas: (1) Amargor e acidez fixa; (2) Cor e OD; (3) Cor e etanol e (4) Acidez total e pH. Essas correlações poderiam ser explicadas pelo acúmulo de molibdênio pela biomassa [140], ou seja, assim como em selênio e seu bioacúmulo, o número de leveduras poderá ter correlação direta com a produção de etanol. Assim como em cromo, Bengough e Harris (1955) [149] descrevem a presença de molibdênio no material causador da turbidez de cervejas, e a partir dos resultados apresentados na **Figura 3.12** (p.94), as cervejas com molibdênio ficaram mais claras (1 EBC a menos que a cerveja controle), podendo ser uma causa da correlação negativa entre cor e OD e cor e concentração de etanol.

Figura 3.15: Matriz de correlação de Pearson para a cerveja com presença de Selênio, Cromo e molibdênio



Para uma melhor análise dos dados, ferramentas quimiométricas de PCA e HCA foram empregadas. O modelo de PCA foi construído com a escolha de quatro componentes principais e com autoescalamento como pré-processamento (Apêndice C – Tabela A.20 e Figura A.5). O modelo construído contou com ausência de *outliers* (Figura A.6). O resultado encontrado para as duas primeiras componentes (Figura 3.16) apresentou uma boa separação entre os agrupamentos dos nutrientes.

Figura 3.16: Modelo de PCA entre primeira e segunda componentes aplicado em características físico-químicas de cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.

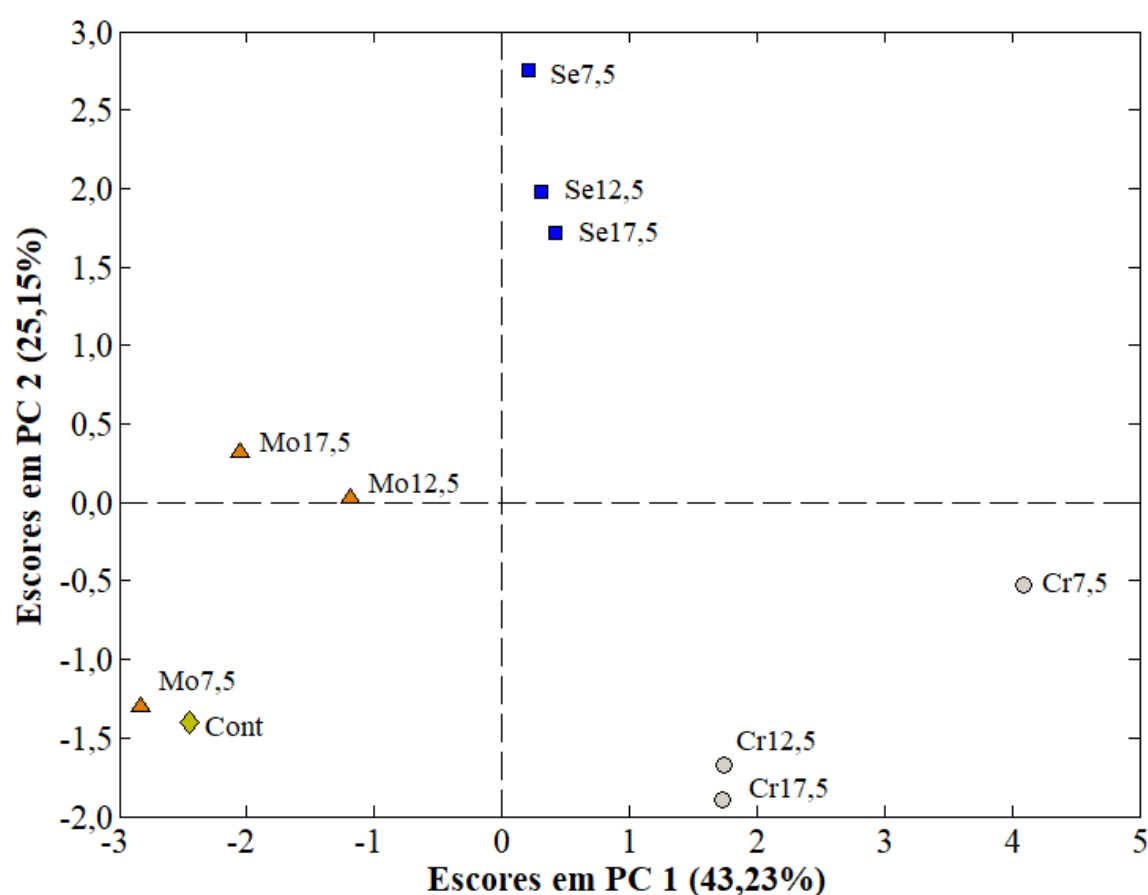
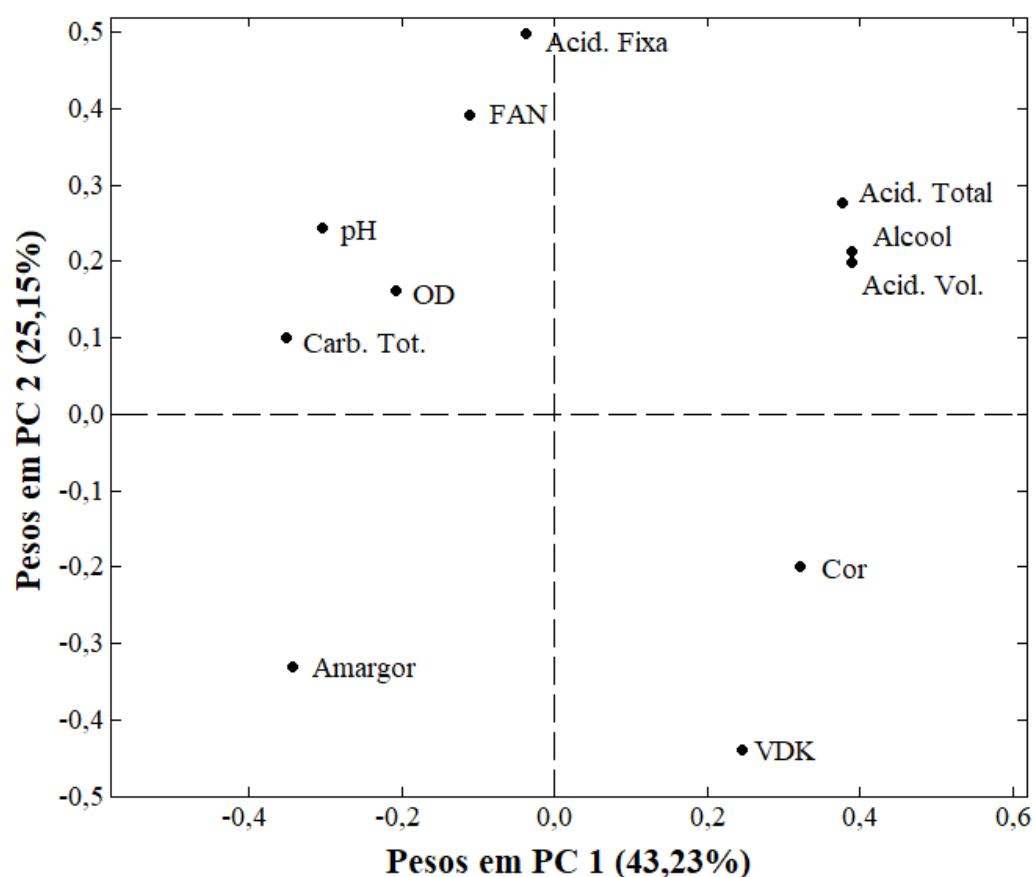


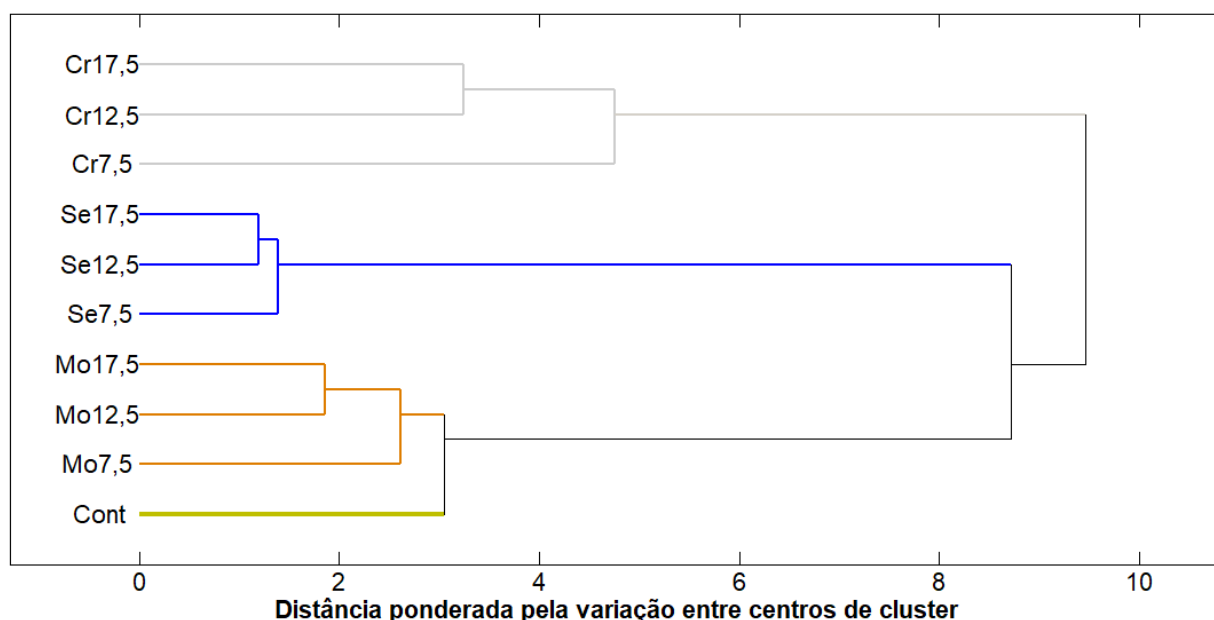
Figura 3.17: Gráfico de pesos de PC1xPC2 aplicado em características físico-químicas de cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.



Conforme **Figura 3.16**, amostras com adição de cromo puderam ser agrupadas pela PC1, enquanto amostras com adição de selênio foram agrupadas pela PC2. A amostra de cerveja com adição de 7,5% de IDR de molibdênio foi a que mais se assemelhou com a amostra controle e com o aumento do teor de Mo, nota-se uma distinção entre estes dois grupos. Pelo gráfico de pesos ou *loadings* (**Figura 3.17**) é possível verificar quais as variáveis físico-químicas que foram capazes de agrupar as amostras. Assim como foi possível verificar nos resultados de VDK (**Figura 3.14**, p.97) e uma leve diferença na cor (**Figura 3.11**, p.92), as amostras com adição de cromo foram mais bem agrupadas por estes dois fatores. Já as amostras de selênio estão bem agrupadas pela segunda componente principal, a partir de FAN, acidez total, etanol e acidez volátil. As amostras controle e Mo7,5 estão relacionadas ao amargor, podendo então se assemelhar entre si e diferir das outras amostras com adição de molibdênio (**Figura 3.11**). A PC3 foi capaz de separar a amostra Cr17,5 (**Figura A.8**) com relação a OD (**Figura A.9**). Já pela PC4, não houve uma boa separação de amostras (**Figura A.10** e **Figura A.11**).

Porém não há uma clara definição se as amostras de molibdênio estão no mesmo grupo que a amostra controle e devido a isso, análise de *cluster* a partir de HCA também foi realizada. O modelo de HCA foi construído a partir do método de Ward, com pré-processamento autoescalamento e com uso de PCA com a escolha de 4 componentes principais. O modelo obtido está apresentado pela figura **Figura 3.18**, onde também há uma separação clara entre as amostras com adição de cromo e selênio. A HCA pode ser analisada com a distância euclidiana entre amostras e a formação de *clusters* das amostras com maior semelhança. De forma a se analisar o dendrograma, grupos distintos e compactos foram formados, e neste resultado o primeiro *cluster* formado ocorre entre Se17,5 e Se12,5, seguido da união desse *cluster* com a amostra Se7,5. Pela HCA, as amostras com adição de molibdênio se assemelham com a amostra controle, mostrando que pela PCA poderia ter ocorrido este agrupamento. Assim, a menor diferença físico-química de adição dos micronutrientes estudados está relacionado a adição de molibdênio.

Figura 3.18: Dendrograma de HCA aplicado em características físico-químicas de cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.



3.4 Conclusões

Em pesquisas recentes, o uso de selênio em leveduras já foi estudado no contexto da sua biotransformação e concentração em leveduras. Este trabalho mostra que além da capacidade de biotransformação em cervejas, a adição de micronutrientes de selênio em cervejas do tipo *ale* pode alterar as características físico químicas da bebida, assim como acidez e FAN.

Este trabalho traz também estudos do comportamento de molibdênio em cerveja, sendo que para conhecimento dos autores não foram encontrados relatos com este estudo. O molibdênio trouxe características semelhantes as amostras controle, com separação pelo amargor. Em amostras com mais de 12,5% de IDR o molibdênio se diferenciou um pouco e apresentou características interessantes como a correlação entre o aumento do número de leveduras e maior produção alcoólica.

Já para o cromo, apesar de seus efeitos benéficos para a saúde humana em concentrações adequadas, não foram encontrados estudos dos seus efeitos em características físico-químicas. E novamente isso fez com que este trabalho tenha mais características inéditas. Pela PCA, houve uma clara separação de amostras de cromo pela primeira componente, estando relacionados com cor e VDK. Notaram-se correlações positivas entre os compostos FAN e carboidratos, além do aumento de ácidos voláteis com o aumento da concentração de etanol, e a concentração de etanol em todas as amostras com adição de cromo foram maiores que a concentração das amostras controle.

Este capítulo tem perspectivas positivas para o futuro, abrindo possibilidades de estudos para se entender os perfis cinéticos das fermentações, a concentração dos nutrientes na cerveja final, além de um melhor estudo dos compostos voláteis em amostra. Além disso, o estudo em outras cervejas é outra possibilidade.

Capítulo 4. Estudo do efeito da adição de suplementos comerciais de selênio e cromo na composição de voláteis de diferentes cervejas por HS-SPME-GC×GC–MS

4.1 Introdução

Voláteis são descritores da qualidade da bebida final e podem ampliar o conhecimento da formação de substâncias que agregam sabores de percepção positiva para a bebida. E assim, o uso de cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) para a determinação de voláteis em cerveja se mostra uma técnica promissora. Devido à complexidade da matriz e ao grande número de voláteis presentes, o estudo do perfil de voláteis via GC×GC traz os benefícios de aumentar a seletividade da separação, melhor identificação de substâncias com o uso de MS e em muitos casos o aumento da sensibilidade da técnica. O estudo de cervejas por GC×GC é encontrado de maneira diversa na literatura. Podem ser exemplificados estudos da influência de lúpulos no aroma de cervejas [109], o estudo metabólico em cervejas Lager [176], reconhecimento de padrões na bioaromatização de cervejas [177], comparação de diferentes tipos de preparo de amostras [87] e a determinação de compostos que caracterizam a oxidação a bebida [110]

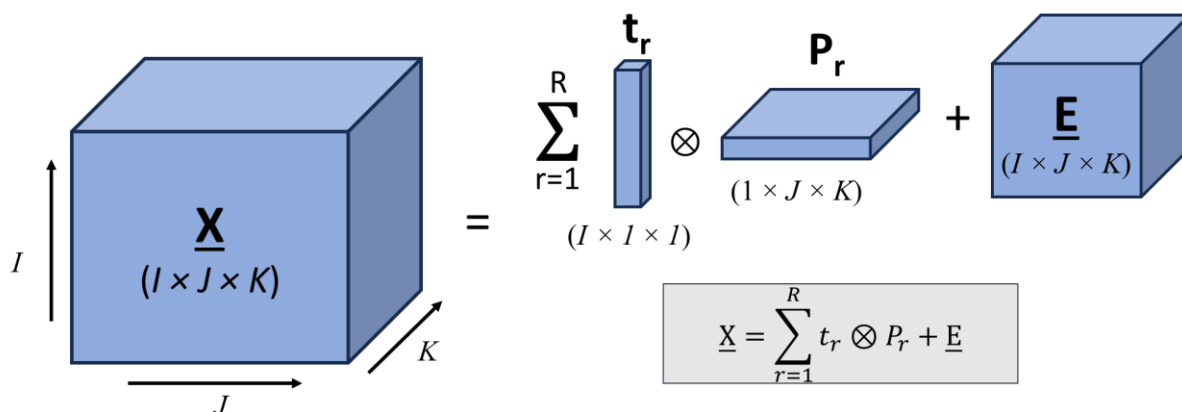
De modo geral, o uso de HS-SPME para preparo de amostra é um dos mais aplicados na determinação de voláteis pela literatura para GC [82-84] assim como na GC×GC [76,87,88]. Como relatado por Nolvachai e colaboradores em 2023, são mais de 8000 publicações aplicando SPME e GC em amostras diversas, mostrando assim as vantagens do uso desta metodologia tal como a capacidade de redução de uso de

solventes, ser ambientalmente amigável, procedimento relativamente simples para o operador, sua versatilidade, seletividade e sensibilidade, além de auxiliar no *clean up* da amostra [178]. Como metodologia de preparo de amostras é inerente que existam desvantagens, tendo como exemplos o preço da fibra, o tempo de análise e limitações quanto a capacidade de extração. Apesar dessas desvantagens, a SPME oferece potencial de ser uma metodologia eficiente de preparo de amostras para voláteis em cervejas.

No que diz respeito à análise de dados, ferramentas quimiométricas são excelentes formas de se analisar as informações obtidas pelo GC×GC, uma vez que são gerados conjuntos de dados extensos, podendo-se extrair informações úteis. Dentro da quimiometria encontram-se ferramentas como a análise de componentes principais (PCA)[179] e ferramentas *multiway* [180] e, dentro deste conjunto, existe a análise multimodo de componentes principais (MPCA) [181]. O MPCA já foi aplicado em estudos como melhoria de processos em indústria farmacêutica [182], influência de leveduras em cerveja [177], composição de petróleo por GC×GC [183], monitoramento de processos fermentativos [184] e detecção de problemas durante a fermentação de vinhos [185]. Seu uso em dados de GC×GC vem sendo descrito na literatura como uma alternativa promissora para a análise exploratória dos dados [177,183,186,187].

Algebricamente, a MPCA pode ser representada conforme **Figura 4.1**, onde a decomposição matricial é similar ao apresentado em PCA. Detalhando-se esta operação tem-se a decomposição de uma matriz tridimensional ($\mathbf{X}$) no somatório do produto de Khatri-Rao entre vetores de escores ($\mathbf{t}$) e matrizes de peso ($\mathbf{P}$), além do tensor $\mathbf{E}$ contendo os erros do modelo. A MPCA é equivalente à performance da PCA em matrizes bidimensionais grandes, uma vez que o algoritmo para esta ferramenta *multiway* conta com a etapa de desdobramento ou *unfolding* [188].

Figura 4.1: Demonstração gráfica do modelo MPCA com a representação da decomposição de uma matriz tridimensional ($\underline{X}$) no somatório do produto entre vetores de escores (t) e matrizes de peso (P), além do tensor $\underline{E}$ contendo os erros do modelo



Logo, este capítulo tem por objetivo realizar o estudo exploratório de dados cromatográficos de GC×GC utilizando a MPCA em amostra de cerveja com suplementação mineral de Cr e Se. Essa suplementação foi realizada em conformidade com as resoluções brasileiras utilizando-se suplementos comerciais na etapa inicial da fermentação de 4 estilos diferentes de cerveja.

4.2 Materiais e métodos

4.2.1 Materiais e reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram hexano (grau HPLC), metanol (grau HPLC) e cloreto de sódio da marca Merck (Darmstadt, Alemanha); 2-octanol (99%) (I.S.) e n-alcanos C8-C21 (99%) fornecidos pela Sigma Aldrich (Castle Hill, NSW, Austrália).

Os micronutrientes usados foram em acordância com a legislação [123] com o uso de selenometionina (CAS 1464-42-2) da marca Microgenics (Preston, VIC, Austrália) em concentração 372,6 µg por cápsula e picolinato de cromo (CAS 14639-25-9) da marca Nature's Own em concentração 400 µg por cápsula vendidos no comércio regional de Melbourne, Austrália.

Os materiais usados para a produção das cervejas foram kits de produção de cerveja do tipo *Australian Pale Ale*, *Stout* e *Canadian India Pale Ale*, levedura SafAle US-05 (França) e lúpulo Enigma da marca Home Make It (Clayton, VIC, Austrália)

4.2.2 Produção da cerveja

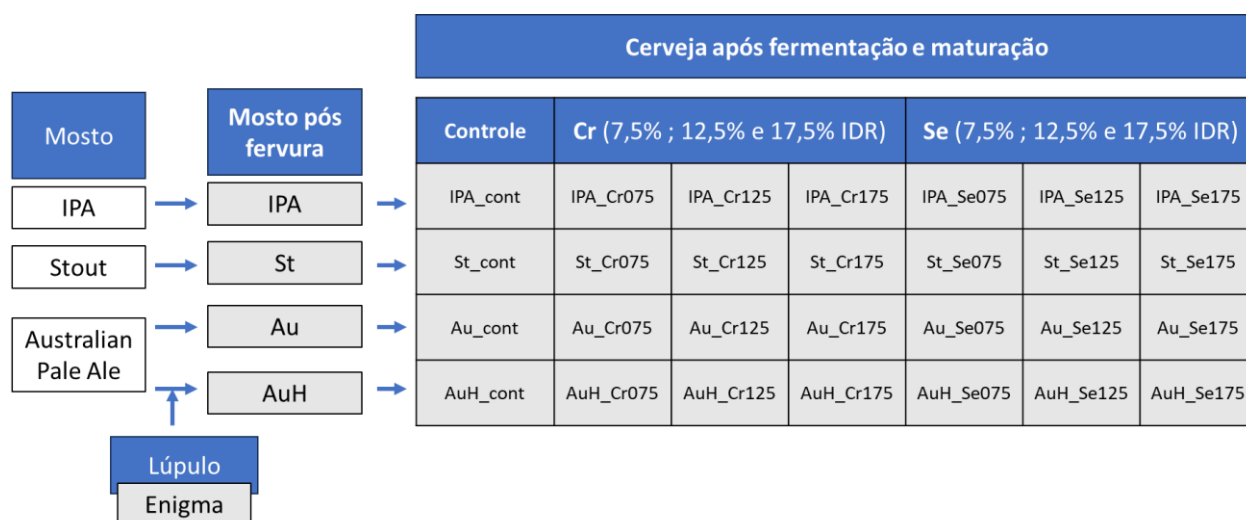
Nesta etapa, os aparatos a serem utilizados foram sanitizados com álcool 70% para evitar a contaminação. A forma de produção foi em conformidade as indicações fornecidas pelo fabricante do kit da cerveja. O kit usado possuía duas frações: extrato do estilo da cerveja (1,7 kg) e um “aprimorador de cerveja” de 2 kg composto por dextrose, maltodextrina e malte seco. Após a sanitização do recipiente para preparo do mosto e secagem do mesmo, o aprimorador foi acomodado com a adição de 2 litros de água quente (aprox. 100 °C) e agitação do conteúdo até se obter uma solução homogênea. O extrato foi aquecido por 15 min e vertido no mosto até sua dissolução por completo. Vinte litros de água fria foram adicionados a mistura com agitação vigorosa e completou-se o mosto até a obtenção de 23 L de volume total. Uma alíquota de 250 mL do mosto *Australian Pale Ale* foi retirada antes da adição de lúpulo. Para o mosto com adição de lúpulo, parte do mosto foi aquecida por 5 min com 40 g do *pellet* para posterior adição no mosto final.

A fermentação ocorreu a 20 °C em fermentadores do tipo *blow off* confeccionados especificamente para este experimento. Tubos de fundo cônico de 15 mL foram usados e o sistema vedado, permitindo-se a saída do gás por uma mangueira transparente de 1/8” com saída posicionada em um tubo de ensaio preenchido com água e álcool. A levedura foi ativada conforme informações do rótulo onde a massa de levedura (0,1438 g) foi considerada para o volume de 250 mL de mosto. Ela foi ativada por hidratação em 20 mL de mosto, o sistema foi aquecido a aproximadamente 25 °C, seguido por descanso de 20 min para posterior mistura em mosto a 20 °C com aeração.

Em cada fermentador foram preenchidos 11 mL da mistura do mosto e solução do micronutriente. As soluções de micronutrientes foram produzidas na concentração de 3 mg L⁻¹ para Selênio e 1 mg L⁻¹ para Cromo com ambas as soluções tendo água destilada como solvente. A suplementação ocorreu conforme **Figura 4.2**, em níveis de 7,5%, 12,5% e 17,5 % de IDR e comparadas com amostras controle assim como seu mosto e lúpulo, onde os códigos das amostras estão apresentados em cinza com

sua injeção em GC×GC. Todas as amostras foram fermentadas em replicatas (n=3) com fermentadores diferentes para cada uma delas, totalizando 84 fermentadores.

Figura 4.2: Níveis de suplementação de micronutrientes de cromo e selênio na fermentação de cervejas *Canadian Indian Pale Ale* (IPA), *Stout*, *Australian Pale Ale* com e sem adição do lúpulo Enigma.



As fermentações ocorreram por 6 dias (~ 148 h) seguidas da maturação que ocorreu a 0 °C por 30 dias. Anteriormente à maturação, a cerveja não maturada foi filtrada e amostras foram acondicionadas em tubos de fundo cônico de 15 mL, sendo fechados com suas respectivas tampas. Ao fim da maturação, as amostras foram preparadas para análise.

4.2.3 Preparo de amostras

Todas as amostras de cerveja foram desgaseificadas por ultrassom por 15 min e mantidas a 0 °C até o momento da análise. Para o preparo de amostras foi utilizado a microextração de fase sólida (SPME) por *Headspace* (HS) previamente a injeção no sistema de cromatografia a gás.

A metodologia de preparo de amostras foi baseada no trabalho de Martins e colaboradores [76]. O procedimento contou com o uso de um suporte manual e uma fibra de espessura 50/30 µm e filme de divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) com núcleo StableFlex (Supelco, Castle Hill, Austrália), acondicionada de acordo com as orientações do fabricante. O volume de 5 mL de cerveja foi misturado com 1,5 g de NaCl e 5 µL de solução de 38,4 mg L⁻¹ 2-octanol

em metanol em vial transparente de borossilicato e 20 mL com tampa rosqueável. A extração ocorreu em agitação constante com barra magnética, temperatura de 40 °C em placa de aquecimento, com tempo de equilíbrio de 10 min e sorção por 30 min. Após a extração, a fibra foi introduzida no injetor do sistema cromatográfico e a dessorção ocorreu por 3 minutos.

O índice de retenção (R.I.) foi calculado pela equação de Van den Dool e Kratz (**Equação 2.7**, p. 22) com uma série de alcanos (C8-C21), analisados utilizando 20 µL de C8-C15 a 100 mg L⁻¹ em hexano, 5 µL de C16-C21 a 100 mg L⁻¹ em hexano e extraídos por HS-SPME (mesmas condições das amostras). As alíquotas foram diretamente transferidas para um *vial* de vidro de 20 mL com tampa rosqueável com extração conforme descrito acima.

4.2.4 Condições cromatográficas

O sistema GC×GC-MS aplicado foi um GC Agilent 7890A, com MS quadrupolo simples 5975C (Agilent Technologies), incluindo um sistema modulador de estado sólido SSM1800 (SSM) da J&X (J&X Technologies, Nanjing, China).

O método cromatográfico incluiu a coluna da primeira dimensão (¹D) DB-5ms UI (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm *d_f*) e a coluna da segunda dimensão (²D) SUPELCOWAX 10 (1,0 m × 0,10 mm D.I. × 0,10 µm *d_f*). Colunas capilares de sílica fundida desativada foram utilizados no modulador (1,0 m × 0,15 mm D.I.) e na *transfer line* (0,43 m × 0,10 mm D.I.) enquanto as colunas foram conectadas usando *press fit* de vidro. Foi utilizado gás hélio grau 99,99% como gás de arraste em fluxo constante (1,0 mL min⁻¹). O injetor foi configurado no modo *split* (5:1), a 250 °C e o programa de temperatura do forno foi de 50 °C (3 min), 3 °C min⁻¹ até 185 °C, 10 °C min⁻¹ até 240 °C e tempo total de análise de 53,5 min. As configurações do MS foram as seguintes: fonte a 250 °C, quadrupolo a 150 °C, energia de ionização de 70 eV, modo de varredura 35-400 *m/z* e frequência de 20,9 scans/s. A configuração do modulador de estado sólido, incluiu o mesmo programa de temperatura do forno GC para o forno de entrada do modulador e um incremento de 20 °C acima do forno GC para o forno de saída. O programa de temperatura da armadilha foi -50 °C no modo isotérmico, com período de modulação de 6 s e dessorção de 1 s.

4.2.5 Tratamento de dados

Os processamentos de dados de GC×GC–MS foram realizados utilizando o software Agilent MassHunter Workstation Qualitative Analysis versão 10.0 (Agilent Technologies, EUA) e o software J&X Canvas W1.5.14.30115 (J&X Electronic Technology, Shanghai, China). A identificação por MS foi realizada usando a biblioteca de espectrometria de massas NIST 11.

Os cromatogramas foram exportados no formato “.csv” pelo software Canvas com as seguintes especificações de alinhamento: formato de matriz 2D com SNR (razão sinal ruído) 3, período 6 e 2D *shift* de -4,43.

A análise estatística foi conduzida utilizando o Excel® (Microsoft, EUA), o software MATLAB® 2010a versão 7.13 e 2023a versão 9.14 (MathWorks, Natick, EUA), incluindo respectivamente a ferramenta PLS Toolbox versão 6.5 e 9.3 (Eigenvector Technologies, Manson, WA). A análise estatística multivariada ocorreu por meio do uso de MPCA, conforme já descrito na literatura [177].

4.3 Resultados e discussão

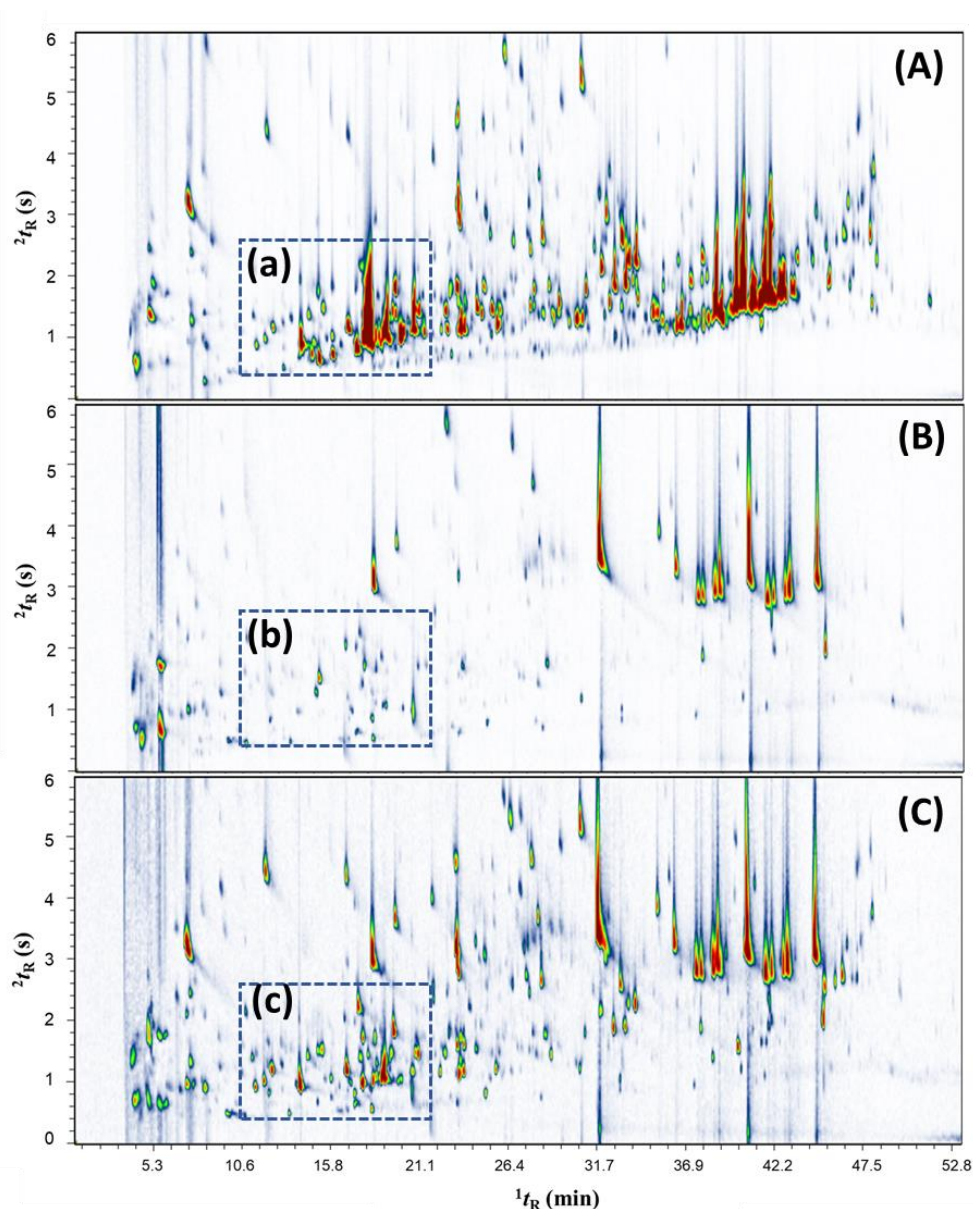
4.3.1 Detecção de voláteis a partir de GC×GC

A complexidade das amostras pode ser visualizada com mais detalhes na **Tabela A.21** (p.193), com as análises comparativas entre lúpulo Enigma, os mostos de cerveja do tipo Australian Pale Ale com e sem adição deste lúpulo e suas respectivas cervejas. Um total de 209 compostos foram tentativamente identificados nas cinco amostras, dentre eles encontram-se presentes hidrocarbonetos, monoterpenos, sesquiterpenos, aldeídos, cetonas, ácidos graxos, ésteres, álcoois e compostos fenólicos. A identificação tentativa foi realizada utilizando o banco de dados NIST 11, e a identidade do composto de maior probabilidade foi determinada considerando o RMatch do MS (>700) e os índices de retenção (± 20 unidades) com base na equação de Van Den Dool e Kratz.

Os cromatogramas das amostras de lúpulo, mosto e mosto com adição de lúpulo estão apresentados na **Figura 4.3**. Quanto ao lúpulo, muitos picos foram reportados, sendo 763 picos descritos pelo software Canvas, e identificação de 145 dessas substâncias, o que caracteriza uma identificação de 20,18% do número de picos, representando 89,76% da área total. Áreas intensas com picos não simétricos são

claros para β -mirceno (^1t_R :18,16 min e ^2t_R :3,39 s) e para região entre 38 e 43 min em ^1t_R , onde estão localizados os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, como exemplo humuleno (40,46 min), α -selineno (41,66 min) e cariofileno (38,66 min). É importante ressaltar que terpenos são compostos majoritários em lúpulos e são responsáveis pelos aromas e sabores de lúpulo. Eles são definidos como substâncias que possuem a repetição de moléculas de isoprenos (2-metil-1,3-butadieno – C_5H_8), na qual monoterpenos contam com a repetição de dois isoprenos ($C_{10}H_{16}$) e sesquiterpenos contam com três repetições ($C_{15}H_{24}$) [189].

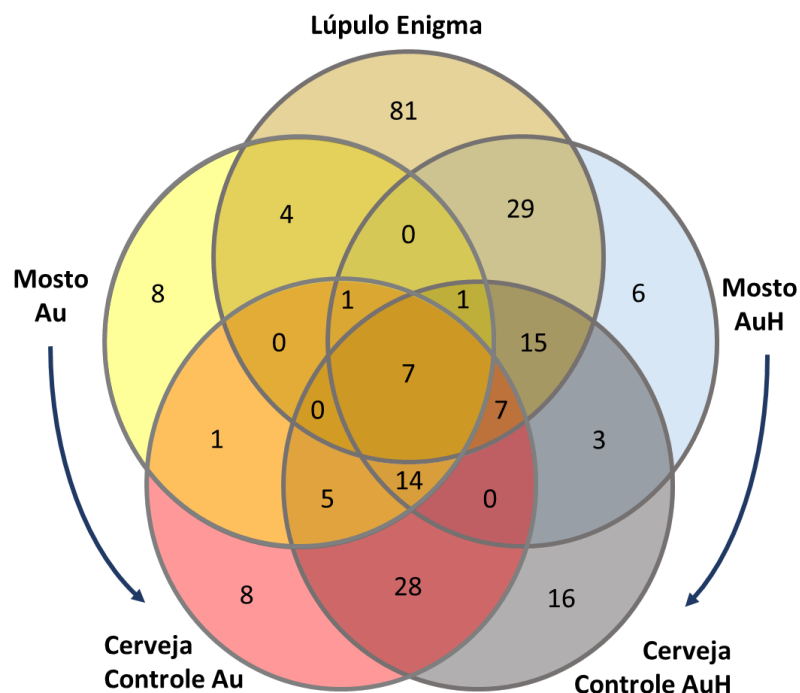
Figura 4.3: Cromatogramas obtidos por HS-SPME-GCxGC-MS para as amostras de (A) lúpulo do tipo Enigma, (B) mosto produzido pelo kit de produção cervejeira e (C) o mesmo mosto com adição de lúpulo Enigma em sua composição.



Para o mosto seguindo apenas as receitas do kit de produção cervejeira, 373 espécies foram encontradas e 41 identificadas (94,19% da área cromatográfica total). O mosto Au demonstrou que já havia presença de VOCs provenientes de lúpulo como o humuleno, linalol e α -terpineol descritos como metabolitos do lúpulo [109,190]. Por fim, a adição de lúpulo garantiu o incremento sensorial a partir da presença de novos voláteis, no qual 566 espécies foram encontradas e 83 identificadas (93,21% da área cromatográfica total). Pela análise visual dos cromatogramas é evidente que a adição de lúpulo influencia o número de picos e suas intensidades, como exemplo nas regiões (a), (b) e (c). Uma forma de ampliar a identificação dos picos poderia ocorrer com o uso de detectores MS de alta resolução.

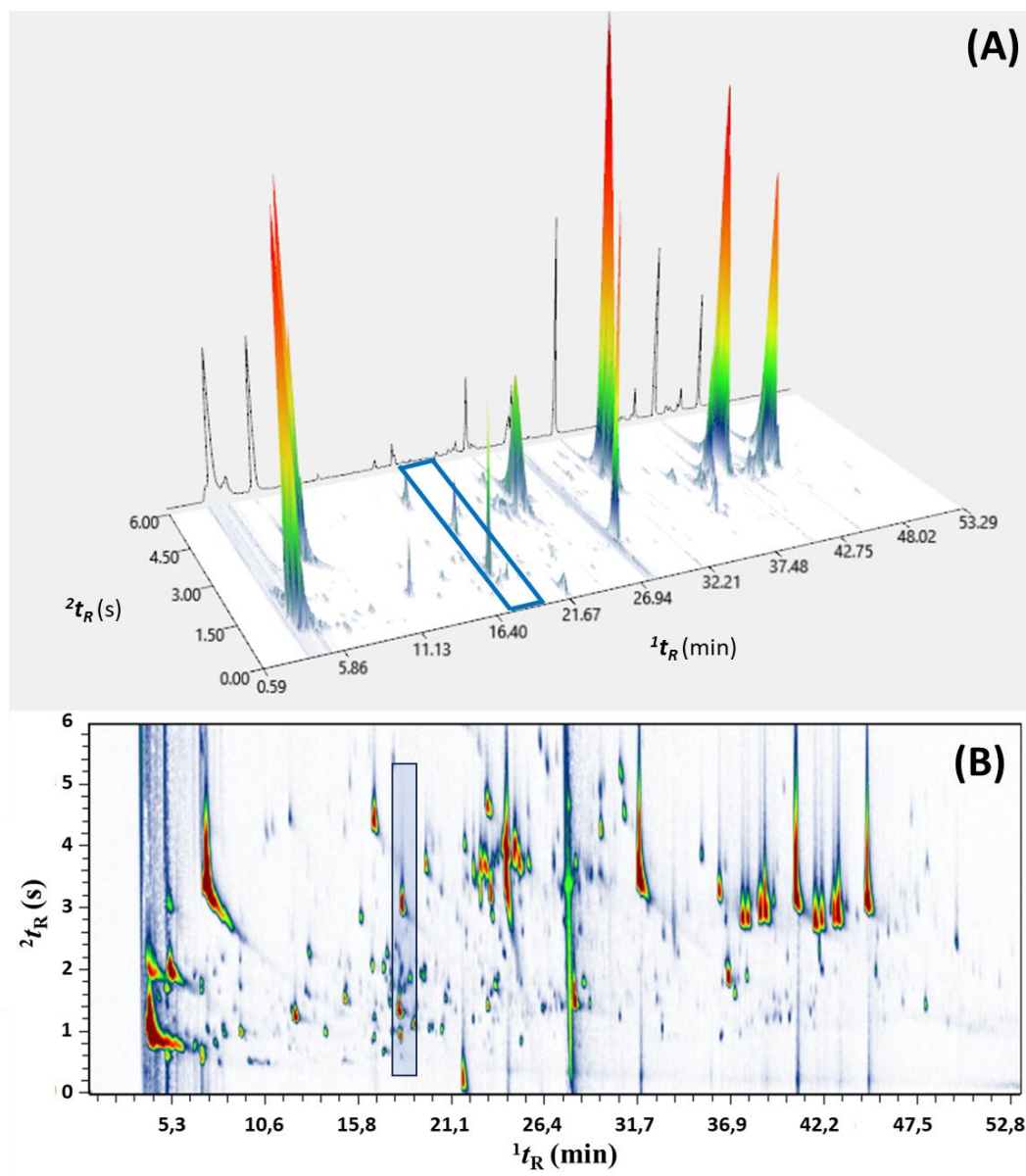
Para uma melhor visualização destes compostos um diagrama de Venn foi elaborado para as cinco amostras, **Figura 4.4**, assinalando-se o comportamento da detecção de substâncias e caracterizando a sua evolução a partir da fermentação. É evidenciado que parte dos compostos presentes no lúpulo não permanecem no mosto (~58,44%), o que pode ser explicado pela massa do lúpulo analisada por HS-SPME-GCxGC-MS ou mesmo pela sua eventual perda no processo de produção do mosto, principalmente durante o processo de fervura. Comparando-se os mostos, nota-se que há presença de compostos que caracterizam estas amostras. Esta diferença, embora a produção tenha ocorrido com as mesmas matérias primas com a exceção da adição de lúpulo, pode-se justificar por valores baixos de concentração assim como uma possível não identificação pelos parâmetros aplicados. Por fim, nota-se que na cerveja há formação de novas substâncias (52 substâncias) produtos da biotransformação do lúpulo ou pelo metabolismo da levedura. Como exemplo da biotransformação tem-se a produção de nerol e citronelol [191]. Já pelo metabolismo, pode-se exemplificar a produção de ésteres como butanoato de etila e acetato de isoamila que respectivamente contribuem sensorialmente para notas de abacaxi e banana [192].

Figura 4.4: Diagrama de Venn para o número de compostos voláteis identificados por HS-SPME-GC×GC-MS em amostras de lúpulo enigma, mostos produzidos a partir do kit de produção cervejeira (Au) e com adição de lúpulo (AuH) assim como a cerveja final.



As vantagens do uso de GC×GC já foram apresentadas no capítulo 2, porém é pertinente expor sua importância para estas amostras. Uma das maiores vantagens desta técnica é o aumento da seletividade, como demonstrado pelo aumento da capacidade de pico descrita pela separação ao se incluir a coluna da segunda dimensão (²D). Para se discutir melhor e demonstrar a capacidade de separação em cerveja, os cromatogramas, tanto na sua versão 3D quanto 2D, estão apresentados na **Figura 4.5**. Pelo cromatograma apresentado na forma 3D é projetado o cromatograma de 1DGC para a coluna presente na ¹D (DB-5ms UI - 30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm *d_f*), no qual picos oferecem grande sobreposição. Como um exemplo em 18,46 min de ¹t_R (retângulo azul) há coeluição de octanal (I=1003) e 2-metilbutanoato de isobutila (I=1004), e com a presença da ²D é possível haver a separação destes compostos.

Figura 4.5: Cromatogramas de cerveja controle AuH por HS-SPME-GC×GC-MS com (A) sua projeção no modo 3D e (B) 2D



Caracterizando as amostras de cerveja pelo seu cromatograma é possível verificar alguns comportamentos relevantes. Duas das áreas majoritárias presentes nos primeiros 10 min são referentes ao etanol (^1t_R 4,16 min e ^2t_R 1,25 s) e álcool isoamílico (^1t_R 7,26 min e ^2t_R 3,37 s). Ambos os picos estão saturados onde etanol é o álcool majoritário produzido durante a fermentação e álcool isoamílico ou 3-metil butanol é um álcool superior com descritores de rosas, adocicado, perfumado e/ou sensação de calor [30].

De forma geral, os picos estão apresentados com boa separação, exceto alguns compostos que serão descritos a seguir. O ácido octanóico (^1t_R 27,78 min) não

apresentou uma boa separação na ^2D , o que é claro pela linha verde que está presente pela distribuição. Este ácido graxo é um *off flavour* conhecido também pelo nome de ácido caprílico (C8:0) com descritores sensoriais de queijo, gordura e grama [30,43] sendo produzido durante a fermentação a partir do acetil-CoA [34]. Outros compostos que se apresentaram com picos intensos e havendo picos fora do ciclo (*wrap-around*), sendo eles álcool fenetílico (^1t_R 24,26 min e ^2t_R 3,55 s), 1-decanol (^1t_R 31,76 min e ^2t_R 3,51 s), 1-dodecanol (^1t_R 40,66 min e ^2t_R 3,26 s) e 1-tridecanol (^1t_R 44,66 min e ^2t_R 3,23 s). Álcoois superiores são formados pelo metabolismo de aminoácidos, como por exemplo, álcool isoamílico é produzido pela leucina.

Os álcoois 1-decanol, 1-dodecanol e 1-tridecanol já estavam presentes no mosto como visto na **Figura 4.3**. A presença destes álcoois superiores com valores significativos de área nas cervejas e mosto vieram do kit de produção cervejeira. Como a componente em comum entre os kits era o “aprimorador de cervejas”, assume-se que estes componentes são provenientes desta matéria-prima. Mais estudos sobre essa proveniência e uso de outros tipos de mosto são interessantes para um melhor entendimento do ocorrido. Todavia, para entendimento das alterações do perfil de voláteis de forma exploratória como objetivado neste capítulo, as matrizes fornecem a capacidade de verificar se há alteração pela adição de micronutrientes de cromo e selênio.

Dada a alta complexidade de determinação destes compostos via estudo global (*untarget*), comprovado pelos numerosos compostos voláteis detectados e representados tanto pela **Tabela A.21** e **Figura 4.4**, e também pela limitação de compostos não identificados, o uso de análises por ferramentas quimiométricas oferecem a vantagem de trazer respostas comparando as diferentes amostras de modo prático. Assim optou-se por utilizar da ferramenta MPCA para realizar a análise exploratória do perfil de voláteis.

4.3.2 Análises quimiométricas

A ideia básica para a análise dos dados foi a extração das informações mais importantes nos cromatogramas de forma eficiente e segura. Para a segurança das informações, os dados foram empregados na forma de replicatas (n=3) de forma a garantir a segurança estatística dos dados gerados. Para o modelo de MPCA, os

componentes principais (PCs) são formados em ordem decrescente de explicação de variância entre os dados originais, ou seja, a PC1 explica a maior variação do conjunto total [193]. A remoção de *outliers* contou com no máximo 3 rodadas de remoção de valores, respeitando o valor máximo de 2/9 do que poderia ser removido do grupo amostral. Além disso, vale ressaltar que dois experimentos (“Au_Se175_repicata3” e “AuH_Cr175_repicata1”) se perderam no processo de preparo de amostras deixando ambas as amostras com valor de $n=2$. A matriz final com todos os cromatogramas obtidos teve um *dataset* com dimensões de 126 (^2t_R) x 528 (^1t_R) x 82 (amostras).

4.3.2.1 Modelo quimiométrico contendo todas as amostras de cervejas

Como forma inicial, o modelo de MPCA levou em conta todas as amostras presentes no *dataset* contando com a escolha de 3 PCs (**Figura A.14**) e com a remoção de um total de 2 amostras anômalas (**Figura A.15 a Figura A.17**). A partir disso foram obtidos os gráficos de escores (*scores*) (**Figura 4.6, Figura A.18 e Figura A.19**) e pesos (*loadings*) (**Figura 4.7**).

Pela **Figura 4.6A** nota-se uma tendência de separação entre os tipos de cerveja. A PC1 explica 82,11% da variância total e agrupa as cervejas IPA na parte direita enquanto as cervejas Stout se agrupam na região esquerda de PC1. Entre esses dois grupos encontram-se as cervejas Australian Pale Ale com e sem a adição de lúpulo, no qual as amostras com adição de lúpulo se agrupam melhor com as amostras da cerveja IPA. O agrupamento tem seu significado químico atribuído a partir da matriz de peso que é apresentada na **Figura 4.7**, sendo ela projetada na forma tridimensional para demonstrar as intensidades e a similaridade com o cromatograma 3D (**Figura 4.5**).

A cerveja do estilo IPA se assemelhou com perfis de voláteis presentes na literatura e é caracterizada por um perfil mais lupulado, o que explica a semelhança com cervejas AuH [194,195]. Quanto à cerveja Stout, apesar de visualmente ser fácil distinguir essa cerveja pela sua coloração escura, o perfil de voláteis conta com semelhanças em relação ao que é reportado [196]. Além disso, este estilo é mais caracterizado por sabores e aromas advindos da torra do malte.

É na PC3 que ocorre o agrupamento de amostras pelo tipo de micronutriente. Com a explicação de 3,23% da variância total, conforme ilustrado na **Figura 4.6**, as amostras controle se localizaram mais abaixo no quadrante negativo de PC3 se assemelhando com o perfil de voláteis das amostras com adição de selênio. Já as

amostras com a adição de cromo tiveram o comportamento de se agruparem com as concentrações adicionadas mais altas localizando-se na parte positiva, principalmente as cervejas Stout. Pelo que foi obtido no gráfico de pesos em PC3 (**Figura 4.7**), nota-se que 12 picos contribuem para esta variância, no qual pela tonalidade, quanto mais vermelho maior a contribuição no lado positivo de PC3 e quanto mais azul, maior a contribuição no seu modo negativo.

Figura 4.6: Gráficos de escores em MPCA entre (A) PC1xPC2 e (B) PC2xPC3 para amostras de cerveja dos tipos Stout (St), Canadian Indian Pale Ale (IPA), Australian Pale Ale (Au) e Australian Pale Ale com uso do lúpulo Enigma (AuH) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.

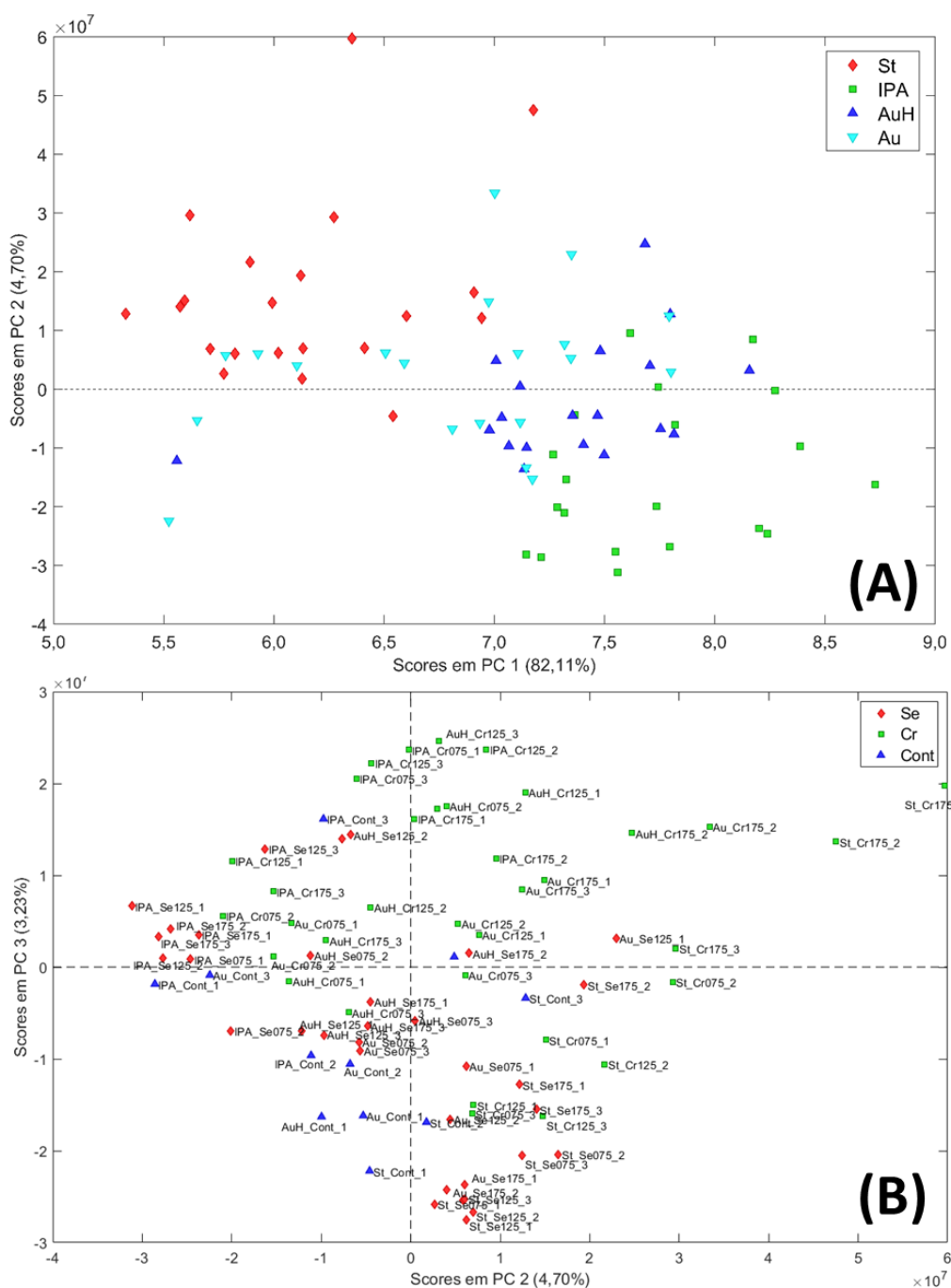
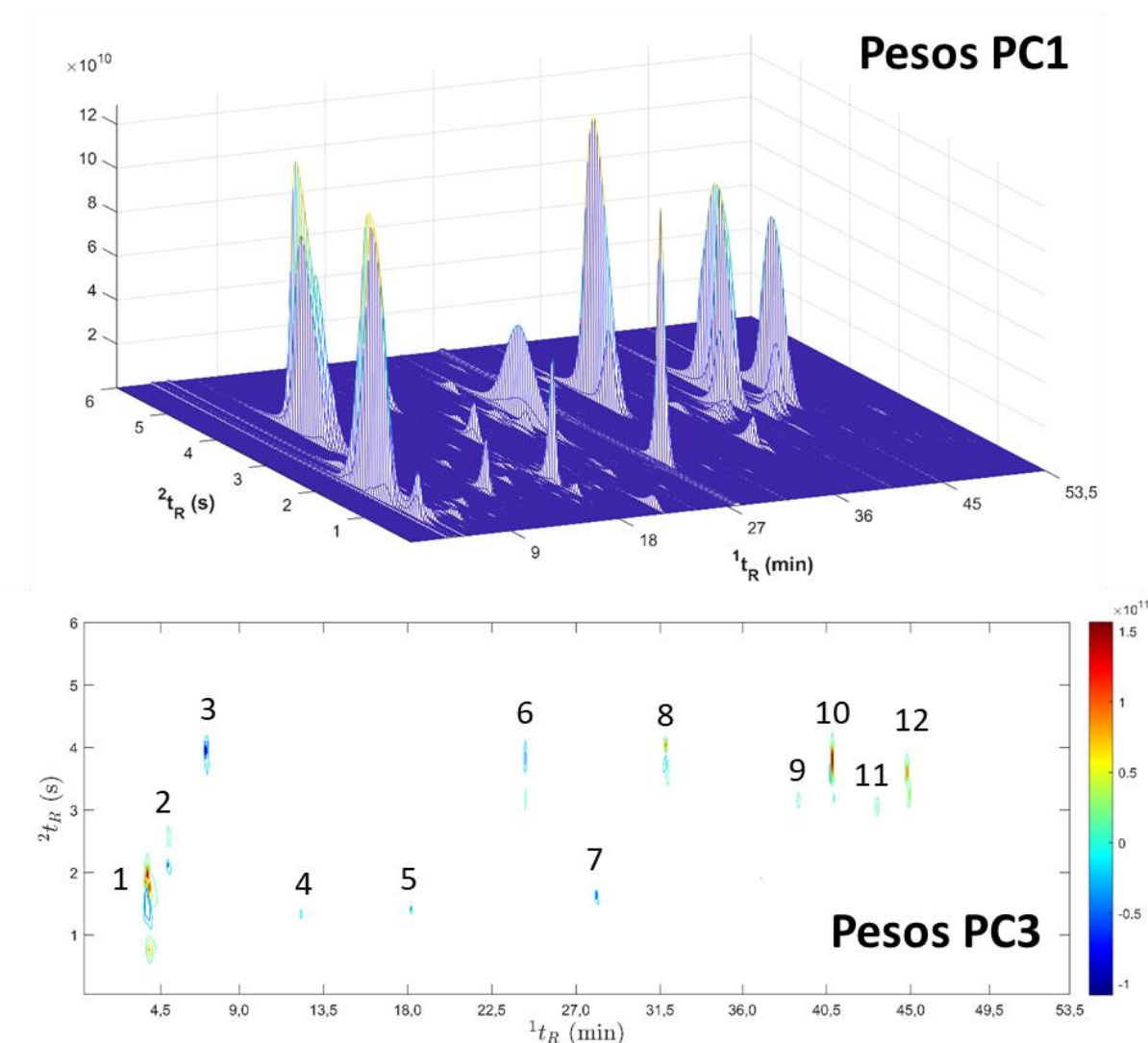


Figura 4.7: Gráficos de pesos em MPCA entre (A) PC1 e (B) PC3 para amostras de cerveja dos tipos Stout (St), Canadian Indian Pale Ale (IPA), Australian Pale Ale (Au) e Australian Pale Ale com uso do lúpulo Enigma (AuH) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.



Os 12 picos apresentados pelo gráfico de pesos em PC3 estão presentes na **Tabela 4.1**. Dentre todos estes compostos, sete tem maior importância no lado positivo da PC3, sendo eles (1) etanol, (2) isobutanol, (8) 1-decanol, (9) 2-metil-1-undecanol, (10) 1-dodecanol, (11) não identificado e (12) 1-tridecanol. Não foi possível identificar o composto representado pelo pico 11 ($I=1538$, **Figura A.20**), porém nota-se que esta substância é um álcool e que há maior similaridade pela biblioteca NIST com o composto 2-metil-1-undecanol ($I=1422$). Assim, pode-se assumir que a adição de micronutrientes de Cromo afetam o perfil de voláteis durante o processo de fermentação, afetando principalmente o agrupamento de álcoois como os 7 compostos apresentados acima.

Tabela 4.1: Identificação de compostos reportados no gráfico de pesos em PC3 para o modelo MPCA com todas as amostras de cerveja

N	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Composto	N	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Composto
1	4,16	1,76	Etanol	7	28,06	1,56	Ácido octanóico
2	5,26	2,01	Isobutanol	8	31,76	3,51	1-decanol
3	7,36	4,00	Álcool isoamílico	9	38,66	3,19	2-metil-1-undecanol
4	12,26	1,27	Acetato de isoamila	10	40,66	3,26	1-dodecanol
5	18,16	1,40	Hexanoato de etila	11	43,18	3,05	Não identificado
6	24,26	3,91	Álcool fenetílico	12	44,66	3,23	1-tridecanol

Para melhor entender o comportamento dos micronutrientes em cada amostra, modelos individuais de MPCA por estilo de cerveja foram desenvolvidos e as cervejas Australian Pale Ale com e sem adição de lúpulo foram descritas com mais detalhe a seguir.

4.3.2.2 Australian Pale Ale (Au)

Para o modelo de MPCA nesta cerveja houve a escolha de 3 PCs e a remoção de um total de 1 amostra anômala. A partir disso foram obtidos os gráficos de escores (**Figura 4.8**) e pesos (**Figura 4.9**). Pelo gráfico de escores nota-se que há uma tendência de agrupamento para cromo em PC2 com variância explicada de 4,07%, e aumento para concentrações de micronutrientes adicionados pelo lado positivo de PC2. O gráfico de pesos para PC2 apresenta os mesmos picos exibidos para o modelo global com todas as cervejas, porém o pico mais significativo para a construção deste modelo foi relativo ao etanol. Isso corrobora com os resultados obtidos nas análises físico-químicas (p.101 e p.102) com a distinção pela parte positiva de PC1 atribuída ao aumento da produção de etanol.

Já para PC3, houve uma explicação de 3,07% da variância total com o agrupamento de amostras com adição de selênio em maiores concentrações pela parte negativa desta componente. A partir dos pesos de PC3 consegue-se distinguir que os compostos 1-heptanol (16,81 min e 4,40 s), ácido octanóico (27,94 min), álcool fenetílico (24,26 min e 3,91 s) e alguns compostos não identificados na região entre 36 e 45 min influenciam a variância de PC3. Podendo assim verificar que a presença de selênio também pode alterar o perfil de voláteis na cerveja.

Figura 4.8: Gráficos de escores em MPCA entre (A) PC1xPC2 e (B) PC3xPC4 para amostras de cerveja do tipo Australian Pale Ale (Au) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.

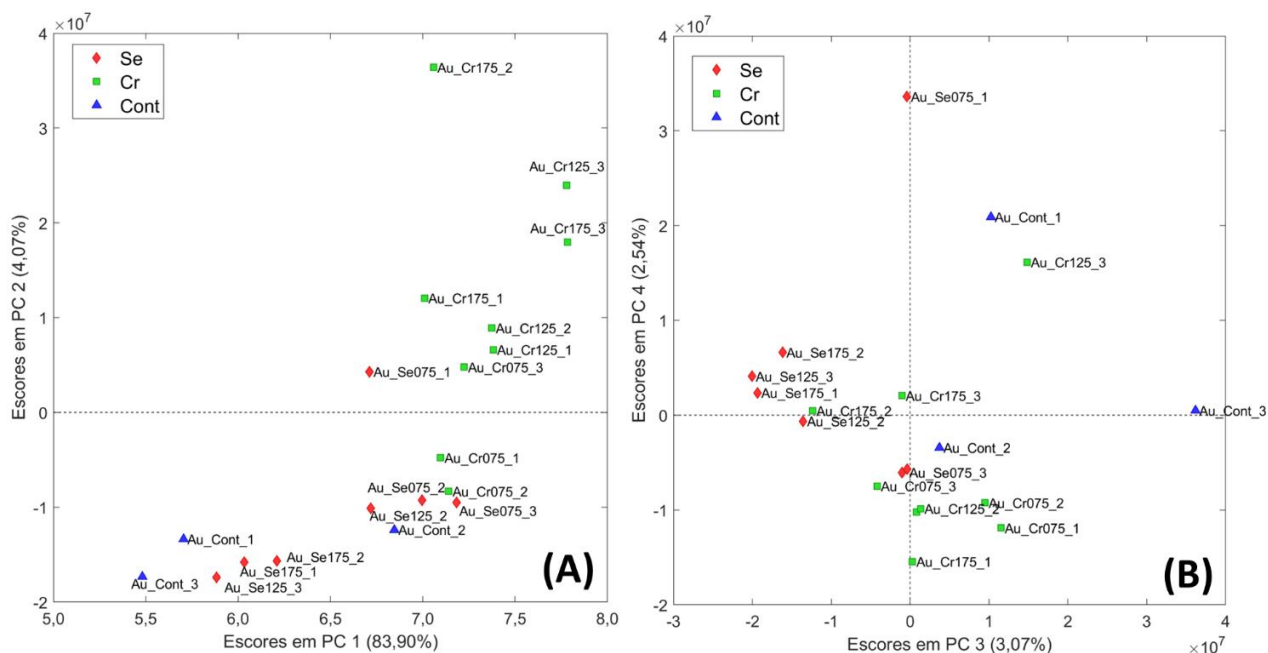
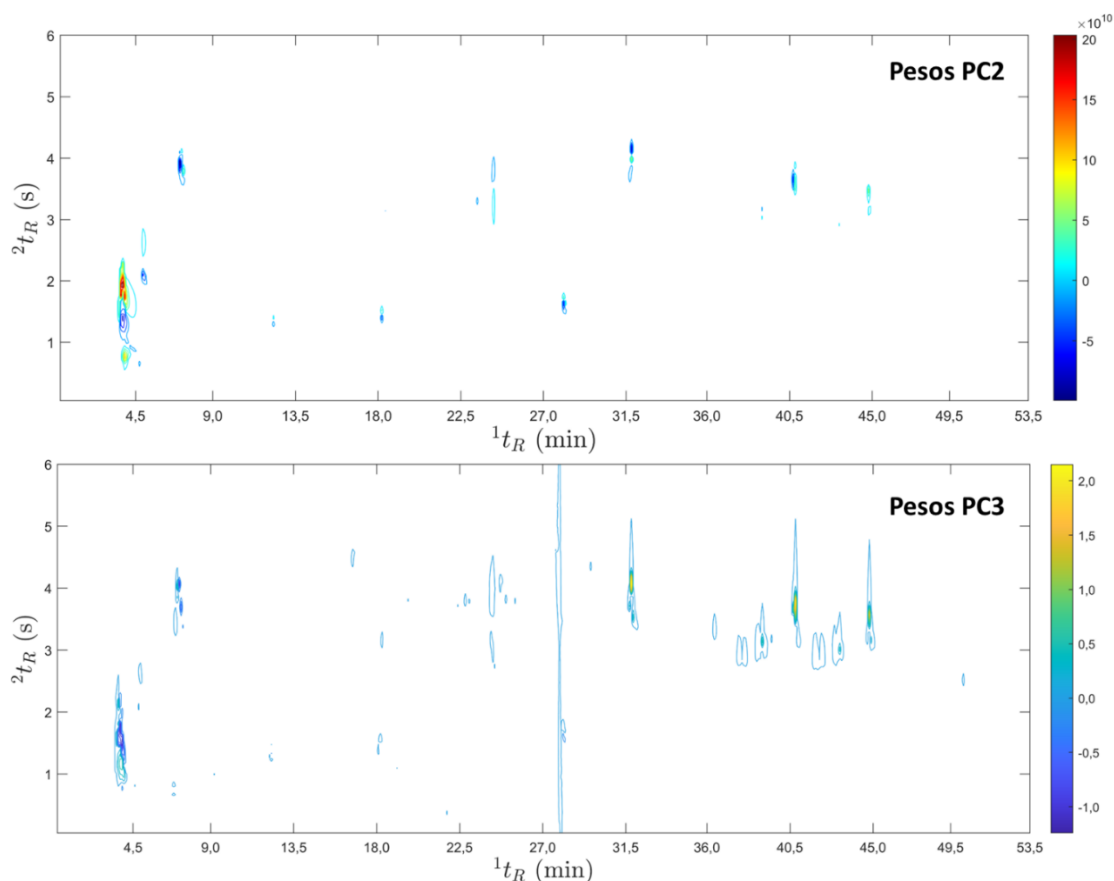


Figura 4.9: Gráficos de pesos em MPCA para PC2 e PC3 em amostras de cerveja do tipo Australian Pale Ale (Au) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.



4.3.2.3 Australian Pale Ale com Lúpulo (AuH)

Como o último modelo, esta cerveja contou com a escolha de 3 PCs e com a remoção de um total de 1 amostra anômala. A partir disso foram obtidos os gráficos de escores (**Figura 4.10**) e pesos (**Figura 4.11**). De modo geral, a única componente em que houve distinção entre os grupos foi em PC3 com uma variância total explicada de 2,47%. Por essa componente é possível confirmar uma distinção entre as amostras controle pela parte negativa e uma leve distinção da adição de cromo na parte positiva. Com o gráfico de pesos em PC3 foi detectado comportamento similar aos anteriores, com o pico mais significativo na parte positiva se referindo a etanol e no modo negativo referente ao álcool isoamílico, além dos álcoois superiores presentes. Um pico novo se fez presente em 36,90 min e 1,85 s referente a 9-decenoato de etila podendo ser causado pela biotransformação de compostos advindos do lúpulo, sendo significativo para a distribuição em PC3.

Figura 4.10: Gráficos de escores em MPCA entre PC1xPC3 para amostras de cerveja do tipo Australian Pale Ale com adição de lúpulo Enigma (AuH) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.

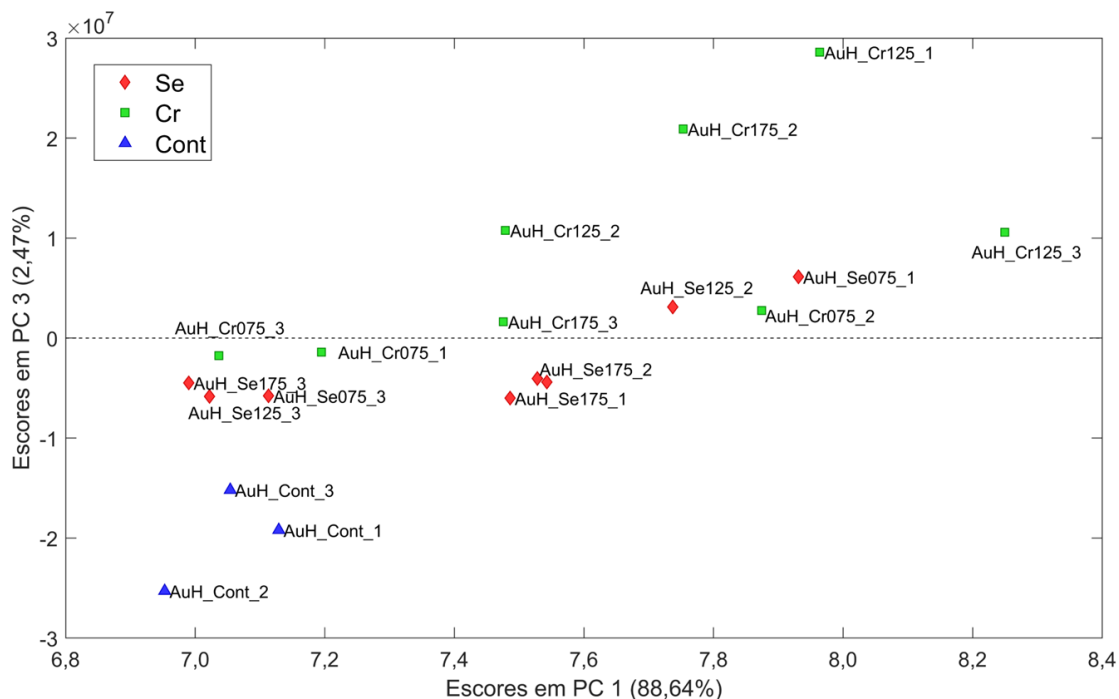
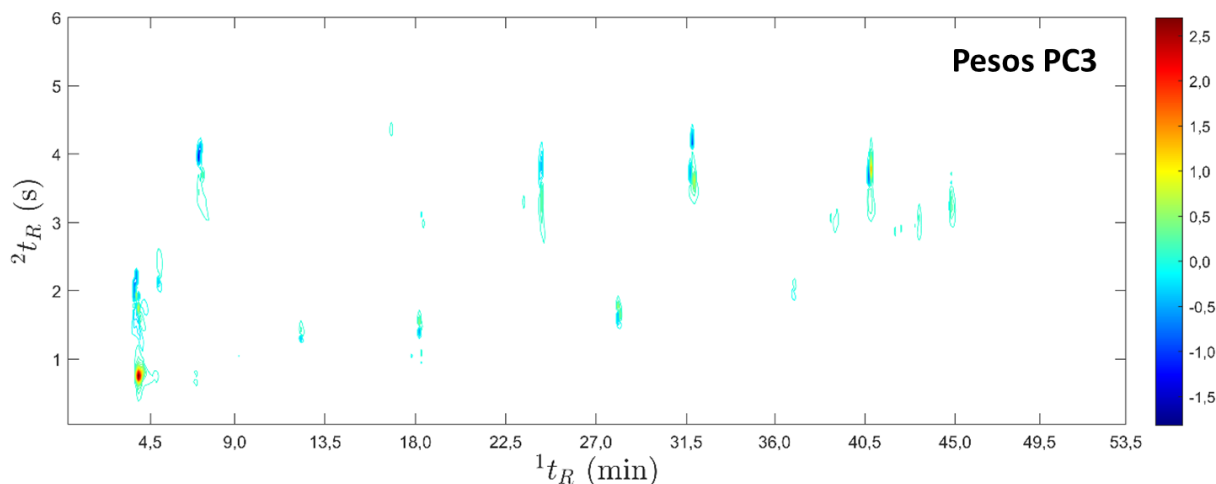


Figura 4.11: Gráficos de pesos em MPCA para PC3 em amostras de cerveja do tipo Australian Pale Ale com adição de lúpulo Enigma (AuH) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.



4.4 Conclusões

O MPCA se mostrou uma ferramenta poderosa para descrever picos significativos nos cromatogramas das cervejas.

Novos estudos com diferentes tipos de mosto se mostram necessários para entender melhor o comportamento descrito neste capítulo. Porém, os resultados se mostram promissores de uma forma geral uma vez que houve a possibilidade de se diferenciar o perfil quando houve adição de cromo. Há também a expectativa de que a suplementação aumente a produção de etanol como confirmado pelas análises.

Conclui-se também que o uso de HS-SPME-GCxGC-MS aplicado a determinação de voláteis em lúpulo traz um grande potencial que será mais bem trabalhado no próximo capítulo.

Capítulo 5. Desenvolvimento e otimização de método para a análise de lúpulos e seus metabólitos a partir de HS-SPME-GCxGC-MS

5.1 Introdução

Lúpulo é um ingrediente de extrema importância em algumas bebidas, tais como chás gaseificados, refrigerantes e cervejas. A sua utilização como matéria-prima foi um ponto importante na história da cerveja, aumentando a popularidade da bebida e modificando as propriedades físico-químicas devido aos compostos ou metabólitos pertencentes a esta planta [197,198]. O lúpulo é ainda o ingrediente mais caro para produção de cerveja, o que traz por consequência um mercado avaliado em US\$7,8 bilhões em 2022, possuindo perspectiva de crescer em mais de US\$5,5 bilhões até 2030 [199]. O sabor do lúpulo está associado aos seus cones, que possuem um pó amarelo denominado lupulina, havendo participação como principal fonte de aroma e composta por ácidos, óleos essenciais e resinas. Cientificamente conhecido como *Humulus lupulus* L., o lúpulo é uma planta da família Cannabaceae, utilizada para aprimorar o aroma, estabilidade e características de amargor da cerveja [17,198].

A composição do lúpulo é complexa e tem características intrínsecas como variedade/cultivo, origem geográfica, fatores ambientais e estabilidade, dentre outros [17]. O sabor, odor e outras propriedades físico-químicas do lúpulo em cervejas geralmente estão associados a cinco tipos de compostos: alfa-ácidos, beta-ácidos, polifenóis, terpenoides e tióis. Os alfa-ácidos são responsáveis pela sensação de amargor e pela estabilidade da espuma, representando uma fração de massa de 2 a

20% da composição do lúpulo [200,201]. Os beta-ácidos influenciam o perfil aromático da cerveja e estão presentes em concentrações mais baixas devido à transformação bioquímica durante o processamento da bebida. Polifenóis, como taninos e flavonoides, atuam como agentes estabilizadores na cerveja, influenciando a turbidez e o sabor [201]. Por fim, terpenoides, assim como tióis, são algumas das classes de componentes encontrados no óleo essencial de lúpulo, que inclui mais de 300 compostos aromáticos [17,18]. Os compostos do óleo essencial podem passar por biotransformação durante a fermentação pela levedura, como exemplo o geraniol pode gerar beta-citronelol e, finalmente, o produto de esterificação acetato de citronelila [202].

Atualmente, existe um grande número de lúpulos disponíveis no mercado, com mais de 100 variedades patenteadas na última década e novos produtos sendo continuamente desenvolvidos e relatados [203]. Quanto a presença de metabólitos em sua composição, existem 363 resultados para as relações metabólito-espécie *Humulus lupulus* que foram encontrados no banco de dados do Sistema KNApSAcK [204], biblioteca que auxilia na pesquisa de estudos metabolômicos e analíticos.

A metabolômica é uma área de pesquisa definida que se desenvolveu nos últimos 25 anos, preocupando-se com a análise abrangente de pequenas moléculas (metabólitos) presentes em matrizes biológicas complexas. Além da metabolômica, outras ciências ômicas se preocupam com matrizes como o lúpulo, tais como proteômica [205], genômica [206], cervejômica [207], lúpulômica [208] e volatilômica [209].

Quanto à análise de compostos orgânicos voláteis (VOC) e volatilômica, a cromatografia a gás (GC) é uma técnica padronizada que tem sido aplicada à determinação de metabólitos de plantas por mais de 50 anos [210]. Vários estudos têm objetivado a análise de compostos-chave de aroma no óleo essencial de lúpulo, como mirceno (relacionado ao odor fresco), linalol e geraniol (ambos relacionados a notas florais) [90]. A GC clássica também já foi aplicada em numerosas abordagens analíticas para estudos de lúpulo, como perfil químico [93,94,211], comparação de diferentes tipos de preparo de amostra [95,98,99] e estudo do efeito do lúpulo no processo de produção de cerveja [92,109].

Como dito no capítulo 2 a SPME chama a atenção como preparo de amostras por ser uma abordagem mais "verde", sendo uma técnica sem solventes que utiliza fibras poliméricas sorventes, é simples, versátil e tem uma ampla base de aplicações, com HS-SPME relatada para amostras em áreas como ambiental, alimentos, medicamentos,

entre outras, embora a aplicação quantitativa do HS-SPME seja bastante complexa [99,178].

De acordo com o nível de complexidade da matriz de lúpulo, a separação com boa resolução e a identificação de compostos podem ser difíceis de alcançar. A cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC) é projetada para essas amostras multicomponentes [99]. As vantagens trazidas pela GC×GC em comparação com a GC convencional incluem aumento do poder de separação, aumento da capacidade de picos e aumento da sensibilidade [178].

O uso da GC×GC no campo da metabolômica em relação aos atributos de desempenho foi demonstrado por Wong e colaboradores [212]. Neste estudo, a GC×GC acoplada à espectrometria de massa quadrupolo-tempo de voo de alta resolução (qTOFMS) foi aplicada a amostras de óleos de folhas de *Eucalyptus spp.* e caracterizou-se quatro espécies diferentes e seus perfis metabólicos *untargeted*. A expressão de perfis metabolômicos também foi estendida ao lúpulo para o estudo de novos genótipos quimiotipados por Yan e colaboradores [103].

O objetivo do presente capítulo foi o desenvolvimento de um método de análise de diferentes amostras comerciais de lúpulo, aplicando as técnicas HS-SPME e GC×GC para obter o perfil químico e a quimiotipagem de 5 variedades diferentes de lúpulo, destacando o valor geral da GC×GC na geração de informações valiosas para estudos de caracterização e metabolômica. Com base nas pesquisas realizadas, a partir da revisão bibliográfica efetivada (**Tabela 2.7**, p.59), observou-se que análises abrangentes combinando as técnicas SPME e GC×GC para a análise de lúpulo não foram previamente relatadas na literatura.

5.2 Materiais e métodos

5.2.1 Materiais e reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram hexano (grau HPLC), hexanoato de etila (98%) e metanol (grau HPLC) da marca Merck (Darmstadt, Alemanha); 2-octanol (99%), undecano (99%), (+) canfeno (80%), β-mirceno (90%), D-limoneno (97%), linalol (95%), geraniol (98%), acetato de geranil (97%), humuleno (96%), (-) óxido de cariofileno (97%) e n-alcanos C8-C21 (99%) fornecidos pela Sigma Aldrich (Castle Hill,

NSW, Austrália); e α -pineno (95%), β -pineno (94%) e cariofileno (90%) da TCI (Tóquio, Japão).

As amostras de lúpulo Azacca (AZAC) e Loral (LORA) foram gentilmente doadas pela Carlton & United Breweries (CUB, Abbotsford, VIC, Austrália) e as amostras Cascade (CASC), Enigma (ENIG) e Zappa (ZAPP) foram obtidas pelo comércio regional de Melbourne, Austrália. Todas as amostras foram obtidas no formato de *pellet* tipo 90 armazenadas em presença de nitrogênio e mantidas em freezer até o momento da análise. Mais informações sobre os lúpulos estão apresentadas no anexo D (**Tabela A.22**).

5.2.2 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando dois sistemas diferentes: GC–MS e GC×GC–MS. O sistema GC–MS aplicado foi um GC Agilent 7890A, com MS triplo quadrupolo 7000 (Agilent Technologies, Mulgrave, Austrália) com o primeiro quadrupolo operado com transferência total de íons (TIC). O sistema GC×GC–MS usado foi um GC Agilent 7890A, com um MS quadrupolo simples 5975C (Agilent Technologies), incluindo um sistema modulador de estado sólido SSM1800 (SSM) da J&X (J&X Technologies, Nanjing, China).

O método GC–MS foi adaptado de estudos sobre lúpulo na literatura [99] e incluiu uma coluna DB-5ms UI (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 μ m d_f) conectada à uma linha de transferência (*transfer line*) de sílica fundida desativada (DFS, 1,0 m × 0,18 mm D.I.) ligado até o MS por um adaptador de pressão de vidro (*press fit*). Foi utilizado hélio grau 99,99% como gás de arraste em fluxo constante (1,0 mL min⁻¹). O injetor foi configurado no modo *split* (50:1), a 250 °C. O programa de temperatura do forno foi de 50 °C (3 min), 3 °C min⁻¹ até 200 °C, 10 °C min⁻¹ até 240 °C (3 min) e tempo total de análise de 60 min. As configurações do MS foram as seguintes: *transfer line* a 240 °C, fonte a 250 °C, quadrupolo a 150 °C, energia de ionização de 70 eV, modo de varredura 35-350 m/z e tempo de varredura de 300 ms.

O método cromatográfico de GC×GC–MS, incluiu o uso do modulador de estado sólido, e foi baseado em pesquisas anteriores [103,213] e incluiu a coluna da primeira dimensão (¹D) DB-5ms UI (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 μ m d_f) e a coluna da segunda dimensão (²D) SUPELCOWAX 10 (1,0 m × 0,10 mm D.I. × 0,10 μ m d_f). Colunas capilares de sílica fundida desativada foram utilizados no modulador (1,0 m × 0,15 mm

D.I.) e *transfer line* (0,43 m × 0,10 mm D.I.) e foram conectados às colunas principais usando *press fit* de vidro. O programa de temperatura do GC foi similar ao utilizado nas análises de GC–MS, com valores diferentes para a fonte MS a 230 °C, quadrupolo a 150 °C, limiar a 80, 12500 varreduras (u/s) e 22,8 varreduras/s. A configuração do modulador de estado sólido foi adaptada da literatura [213] e incluiu o mesmo programa de temperatura do forno GC para o forno de entrada do modulador e um incremento de 20 °C acima do forno GC para o forno de saída. O programa de temperatura da armadilha foi -50 °C (8 min), 2 °C min⁻¹ até -20 °C (37 min).

5.2.3 Otimização dos experimentos

Para a escolha da melhor condição de extração, foram otimizados o tipo de fibra, a quantidade de lúpulo e foi realizado um planejamento experimental com as condições temperatura, tempo de equilíbrio e tempo de sorção. Todas as extrações ocorreram com *pellets* moídos em um almofariz, pesados e transferidos para um *vial* transparente de borossilicato de 20 mL e tampa de rosca alocado em um bloco metálico totalmente em contato com o exterior do vial e aquecido via chapa de aquecimento. Além disso, o tempo de dessorção durante os estudos foram constantemente mantidos a 3 min, com início da corrida cromatográfica quando a fibra foi adicionada no *liner* e remoção após este tempo.

Para a escolha da fibra, foram testados 6 tipos de fibra em GC–MS: 100 µm PDMS (Vermelha), 85 µm PA (Branca), 60 µm PEG (Roxa), 65 µm PDMS/DVB (Rosa), 85 µm CAR/PDMS (Azul claro), 50/30 µm DVB/CAR/PDMS (Cinza) e quatro fibras em GC×GC–MS: 100 µm PDMS (Vermelha), 65 µm PDMS/DVB (Rosa), 85 µm CAR/PDMS (Azul claro) e 50/30 µm DVB/CAR/PDMS (Cinza). As condições de extração foram massa de lúpulo de 200 mg, temperatura de extração de 50 °C, incubação de 10 min e extração de 30 min. Todas as fibras foram condicionadas e mantidas em temperaturas conforme recomendações da Supelco.

Para a escolha de massa de lúpulo por análise via HS-SPME, foram estudadas as massas de 25 mg, 50 mg, 100 mg, 250 mg, 500 mg e 1000 mg em replicatas (n=3) no lúpulo Cascade de acordo com quantidades relatadas na literatura [211,214]. Foi estudado um composto para cada uma das sete classes estudadas, conforme significativa presença daquele composto em lúpulo cascade reportado por Yan e colaboradores [103]. Os compostos e classes estudados foram: isobutanoato de

isoamila (Ésteres), β -mirceno (Hidrocarbonetos monoterpênicos), β -linalol (Monoterpenos oxigenados), cariofileno (Hidrocarbonetos sesquiterpênicos), epóxido de humuleno II (Sesquiterpenos oxigenados), 2-undecanona (Cetonas) e perilleno (Furanos).

O planejamento de experimentos foi projetado a partir do planejamento Box-Behnken (BBD) com 3 fatores levando-se em consideração os fatores mais importantes descritos para SPME na literatura e com possível aplicação em lúpulo. Desta forma os fatores escolhidos e seus níveis foram: (a) temperatura de extração: 50 a 70 °C [99], (b) tempo de equilíbrio/incubação: 10 a 30 min [214] e (c) tempo de extração/sorção: 30 a 50 min [215]. O planejamento contou com 15 experimentos conforme apresentado na **Tabela 5.1**, onde os três últimos experimentos são replicatas do ponto central. Os mesmos compostos apresentados na otimização univariada da quantidade de lúpulo, foram estudados pelo BBD, totalizando sete planejamentos representando cada classe.

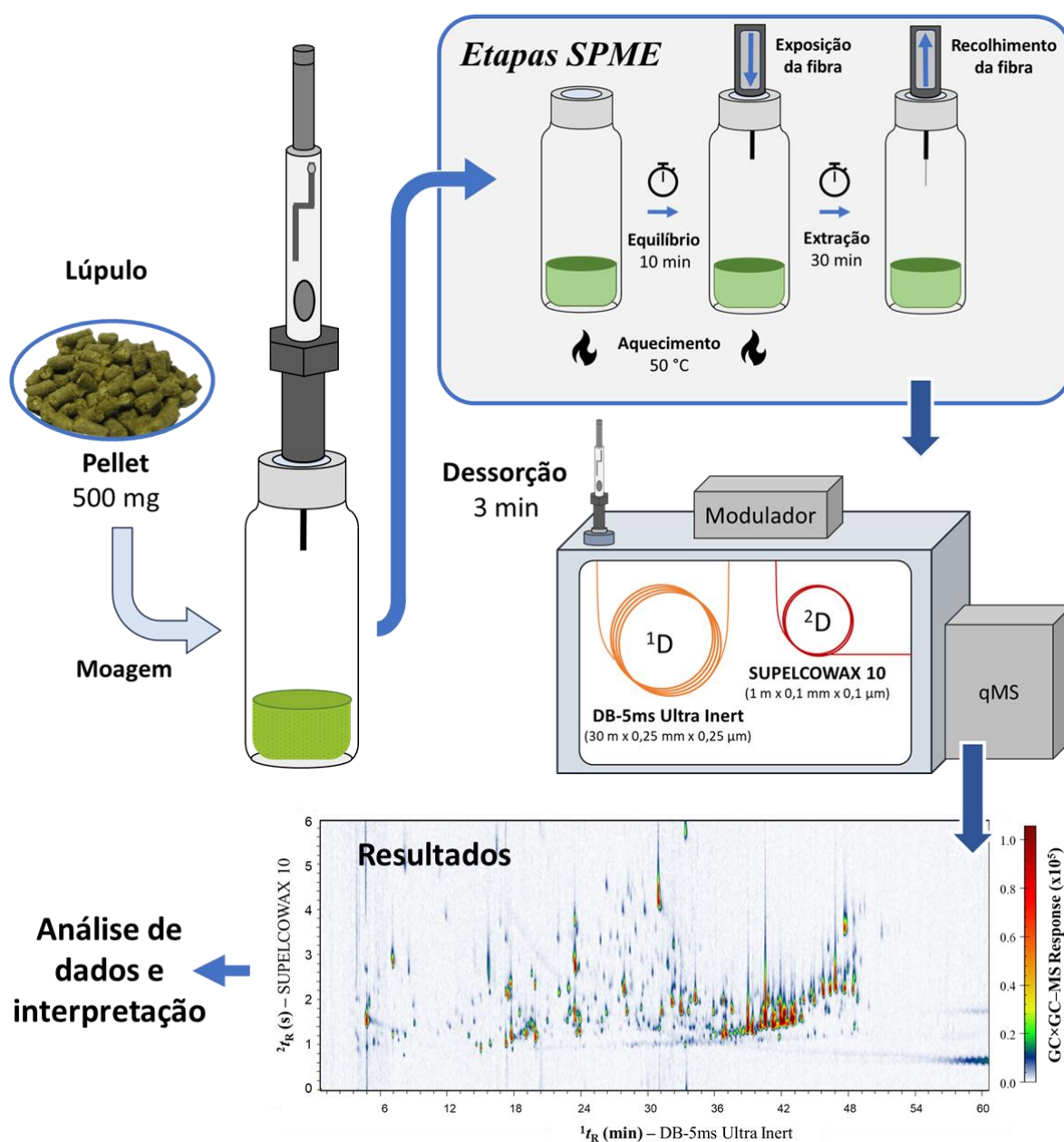
Tabela 5.1: Planejamento de experimentos BBD para otimização de extração de compostos em lúpulo cascade a partir de HS-SPME-GC×GC–MS

<i>Exp</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Equilíbrio (min)</i>	<i>Sorção (min)</i>
1	50	10	40
2	70	10	40
3	50	30	40
4	70	30	40
5	50	20	30
6	70	20	30
7	50	20	50
8	70	20	50
9	60	10	30
10	60	30	30
11	60	10	50
12	60	30	50
13	60	20	40
14	60	20	40
15	60	20	40

5.2.4 Preparo de amostras

O procedimento geral de preparo de amostra e análise (**Figura 5.1**) contou com o uso de um suporte manual e uma fibra DVB/PDMS de 65 μm da Supelco (Castle Hill, Austrália), condicionada de acordo com as orientações do fabricante. Na primeira etapa, os 500 mg dos pellets moídos foram transferidos para o *vial* de 20 mL com tampa rosqueável. Os frascos foram aquecidos a 50 °C em uma placa de aquecimento, com um tempo de equilíbrio de 10 minutos e 30 minutos para a sorção. Após a extração, a fibra foi introduzida no injetor do GC e deixada em dessorção por 3 minutos.

Figura 5.1: Organograma para análise dos lúpulos por HS-SPME-GC×GC-MS.



O índice de retenção (R.I.) foi calculado pela equação de Van den Dool e Kratz (**Equação 2.7**, p.22) com uma série de alcanos (C8-C21), analisados utilizando 20 µL de C8-C15 a 100 mg L⁻¹ em hexano, 5 µL de C16-C21 a 100 mg L⁻¹ em hexano e extraídos por HS-SPME (mesmas condições das amostras). As alíquotas foram diretamente transferidas para um vial de 20 mL com tampa rosqueável com extração conforme descrito acima.

5.2.5 Análise de dados

O processamento de dados e as análises cromatográficas para GC–MS e GC×GC–MS foram realizados utilizando o software Agilent MassHunter Workstation Qualitative Analysis versão 10.0 (Agilent Technologies, EUA) e o software J&X Canvas W1.5.14.30115 (J&X Electronic Technology, Shanghai, China). A identificação por MS foi realizada usando a biblioteca de espectrometria de massas NIST 11.

O planejamento de experimentos foi realizado utilizando o software Statistica 10 (StatSoft, Tulsa, EUA). A análise estatística foi conduzida utilizando o Excel® (Microsoft, EUA), o software MATLAB® versão 7.13 (MathWorks, Natick, EUA), incluindo a ferramenta PLS Toolbox versão 6.5 (Eigenvector Technologies, Manson, WA). A análise estatística multivariada incluiu a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Hierárquica de Cluster (HCA).

5.3 Resultados e discussão

Uma das etapas cruciais na análise de lúpulos e seus compostos voláteis é alcançar uma separação aceitável de picos, resultando no aumento da seletividade e melhorando a identificação de substâncias devido à redução de sobreposição de picos. A complexidade das amostras de lúpulo pode ser observada pela representação na separação do lúpulo Cascade por GC–MS em unidimensional, conforme mostrado na **Figura 5.2(A)**. O cromatograma reporta uma coluna de GC convencional com uma capacidade de pico de aproximadamente 300 para a análise de 32 minutos, o que sugere uma resposta com considerável sobreposição de picos. Por exemplo, "d" (15,4 min) representa o linalol com um conjunto de picos mal resolvidos, e o pico "e" em 22,0 min (geraniol) apresenta um ombro evidente antes de um pico no final do geraniol. A complexidade torna-se imediatamente clara ao comparar o GC–MS (**Figura 5.2(A)**)

com o GC×GC–MS (**Figura 5.2(B)**), com os tempos de retenção nas colunas DB-5ms UI alinhados verticalmente em cada painel.

A detecção de significativamente mais compostos é confirmada no resultado GC×GC, simplesmente pela adição da segunda dimensão (²D) de separação. Sendo uma coluna mais polar (tipo *wax*), a retenção na ²D ocorre de compostos menos para mais polares, indicando assim a polaridade relativa dos compostos que coeluíram na coluna ¹D e servindo como verificação de classe química. Isso leva à ideia de relações de retenção de estrutura molecular em GC×GC [216]. É evidente que a apresentação em 2D do GC×GC, com a maioria dos picos resolvidos, compreende uma grande proporção da composição volátil (*headspace*) da amostra, sugerindo que isso incorpora os requisitos para a análise abrangente de metabólitos [217] e é um método *untargeted* essencial para compostos voláteis [218].

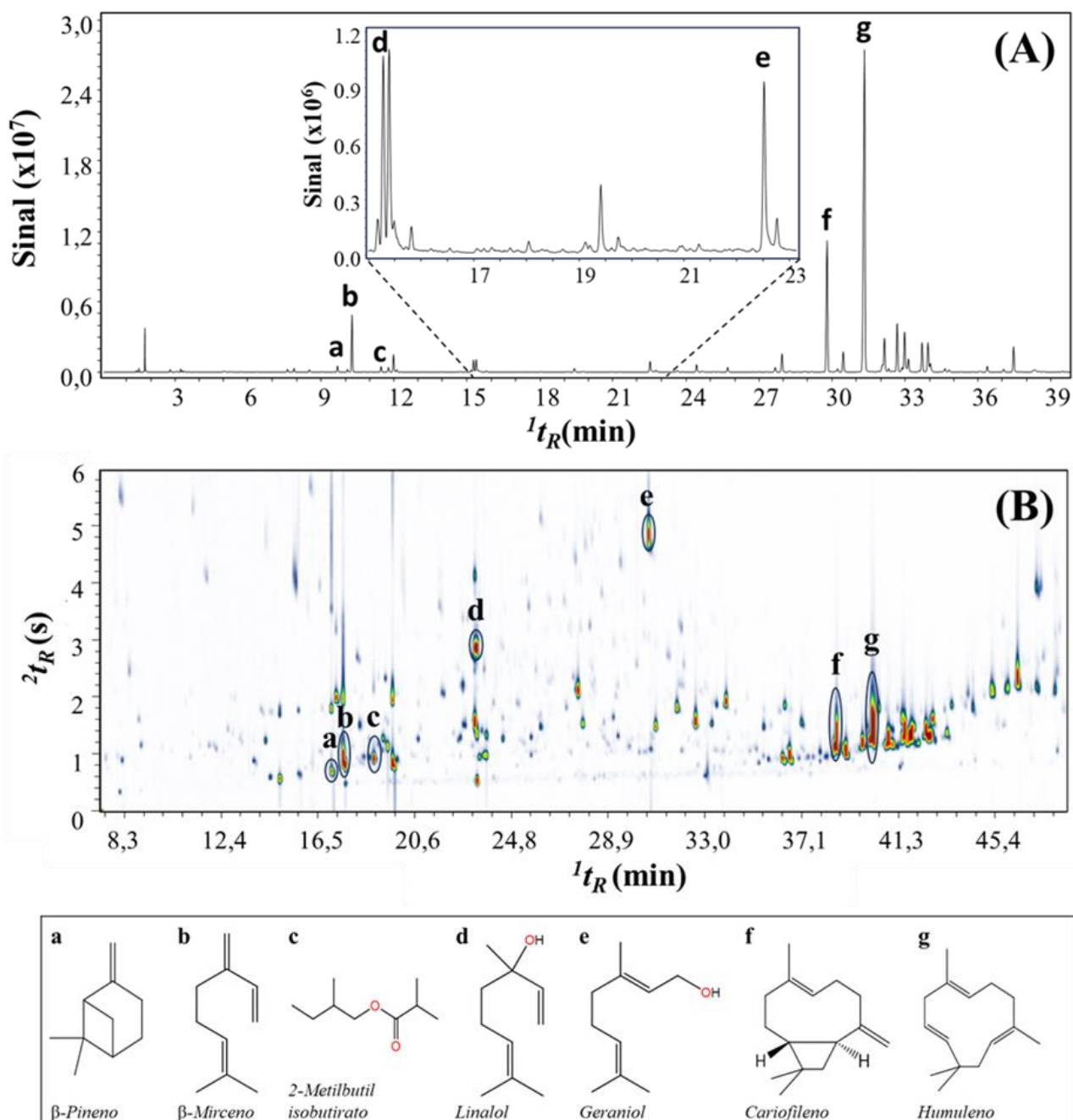
O uso de GC×GC–MS para análise de metabólitos, gerando um maior número de picos, deve também incluir uma melhor identificação pelo MS a partir de picos mais intensos que favorecem constituintes menores, menos interferências de matriz e menos sangramento de fase presente na coluna. Aqui, a análise GC–MS foi semelhante àquela encontrada na literatura [99]. Para GC×GC–MS, a coluna ¹D utilizada foi de fase não polar DB-5ms UI (5% fenil metilpolissiloxano), e duas colunas para a ²D foram testadas; uma fase de polaridade intermediária BPX50 (50% polissilfenileno-fenilsiloxano) e uma fase polar (SUPELCOWAX 10; polietileno glicol), ambas com mesmo tamanho, diâmetro e espessura de filme.

Os resultados (**Figura A.21**) mostraram uma separação aprimorada com a fase polar na ²D, melhor resolução de picos e um maior número de metabólitos registrados. O período de modulação (PM) usado para GC×GC corresponde ao tempo disponível para a conclusão da análise ²D antes que ocorra a presença de pico fora do ciclo (*wrap-around*). Tempos de 4, 5, 6 e 7 s foram testados, com a melhor separação para 6 s e pouco *wrap-around* (**Figura A. 22**).

O método SPME apresentado neste trabalho é vantajoso para o estudo de voláteis em lúpulo. Em comparação com outros métodos anteriormente aplicados (**Tabela 2.7**, p.59), o SPME possui vantagens por ser mais fácil em relação às outras técnicas de extração, requerer menos recursos, não precisar de solventes, usar temperaturas amenas e pequenas quantidades de amostra. Isso limita a degradação dos compostos, sendo ambientalmente amigável com menos consumo de energia e gerando menos resíduos. Este método de preparação de amostra está estabelecido na literatura, as

fibras estão comercialmente disponíveis e a automação é possível, o que pode facilitar a análise.

Figura 5.2: Comparação entre dois cromatogramas de GC–MS (A) e GC×GC–MS (B) aplicando HS-SPME em lúpulo Cascade, onde o GC–MS e a ¹D coluna de GC×GC–MS foram configuradas com coluna DB-5ms UI (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm *d_f*) e a ²D coluna uma SUPELCOWAX 10 (1,0 m × 0,10 mm D.I. × 0,10 µm *d_f*), e a estrutura dos compostos selecionados (C) representada por a-g expressos em (A) e (B).



5.3.1 Otimização dos experimentos

A primeira etapa da seleção das condições otimizadas foi a escolha do tipo de fibra. Para este estudo, analisaram-se 6 tipos diferentes de fibras, iniciando-se a análise via GC–MS (**Tabela 5.2**). A partir dos resultados, notou-se que as fibras azuis (85 µm CAR/PDMS) e cinza (50/30 µm DVB/CAR/PDMS) tiveram o melhor desempenho com o maior número de picos detectados assim como a maior área cromatográfica total. A presença de carboxeno, juntamente com o fator das fibras terem caráter bipolar e adsorvente podem ter acarretado a melhor extração de compostos em lúpulo.

Conforme **Tabela 2.4** (p.53), em que as características das fibras são melhores elucidadas, a fibra cinza é indicada para compostos voláteis e semivoláteis com faixa de massa molecular entre 40 e 275, frente a fibra azul que é indicada para compostos de baixa massa molar com faixa entre 30 e 225. Entretanto, com o aumento da sensibilidade houve também um aumento da presença de picos saturados. Assim, as 2 melhores fibras também foram as que possuíram o maior número de picos saturados. Com o objetivo de selecionar a melhor fibra de SPME para a extração de voláteis em GC×GC, as quatro melhores fibras foram analisadas: vermelha, rosa, azul e cinza.

Tabela 5.2: Estudo comparativo dos tipos de fibras de SPME, pela sua cor e determinação dos compostos em lúpulo Cascade por HS-SPME-GC–MS.

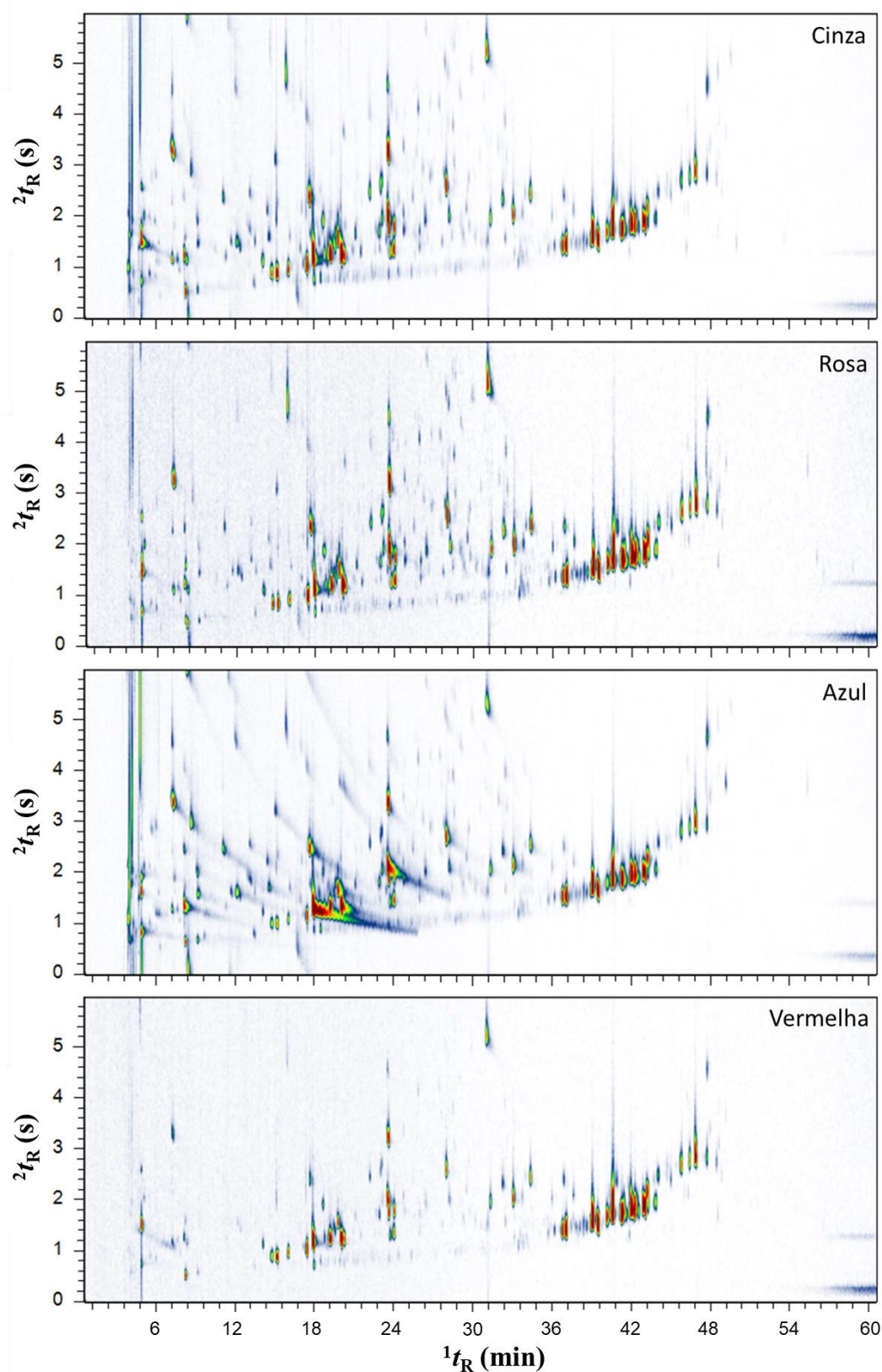
	Vermelha	Branca	Roxa	Rosa	Azul	Cinza
Nº. de picos	185	127	161	196	205	240
Área total	7.34E+08	2.00E+08	7.51E+07	8.48E+08	1.60E+09	1.78E+09
Nº. de picos saturados	2	6	1	5	11	9

Cores das fibras= Vermelha: 100 µm PDMS, Branca: 85 µm PA; Roxa: 60 µm PEG, Rosa: 65 µm PDMS/DVB; Azul: 85 µm CAR/PDMS e Cinza: 50/30 µm DVB/CAR/PDMS.

A **Figura 5.3** mostra a diferença entre os cromatogramas para cada uma das fibras por HS-SPME-GC×GC-MS com o lúpulo Cascade. É possível verificar que a fibra de 100 µm PDMS (vermelha) possuiu menos picos dentre as quatro, enquanto a fibra de 85 µm CAR/PDMS (azul) expôs picos mais evidentes nos primeiros 15 minutos, porém com maior alongamento de picos e possuindo maiores tempos de retenção. Dessa forma as fibras cinza e rosa possuíram as melhores performances com similaridade entre a distribuição de compostos. Devido ao número de picos saturados presentes no

GC-MS, juntamente com um cromatograma que possuiu uma das melhores performances, optou-se por seguir o estudo com a fibra rosa.

Figura 5.3: Cromatogramas de 4 tipos de fibras de SPME, pela sua cor em lúpulo Cascade por HS-SPME-GC×GC-MS.



Para a análise da quantidade de lúpulo pela sua massa, 7 compostos foram escolhidos para representar as classes mais relevantes em lúpulo. As substâncias escolhidas foram definidas por possuírem as maiores concentrações ou serem as mais relevantes conforme a literatura para lúpulos Cascade [103]. Os resultados estão apresentados na **Figura 5.4** em que as áreas cromatográficas foram corrigidas com o padrão interno (IS) 2-octanol. O momento do equilíbrio foi definido a partir do estágio em que o gráfico atingiu estabilidade expressa na forma de linha horizontal. A estabilidade para ésteres, hidrocarbonetos monoterpênicos e monoterpenos oxigenados foram os últimos a atingirem o equilíbrio frente à cetona que foi a primeira. A massa foi definida pela menor quantidade de lúpulo que garantiria o equilíbrio de todos os compostos. Assim, optou-se pela massa de 500 mg de lúpulo para os experimentos posteriores.

A fim de otimizar outros parâmetros da extração, a otimização multivariada por planejamento de experimentos do tipo BBD foi aplicada. Os fatores tempo de equilíbrio, tempo de sorção e temperatura foram selecionados em conformidade com o que foi relatado na literatura. Conforme estudo de Kovačević e Kač (2001) [99] temperaturas entre 25 e 80 °C foram estudadas para humuleno e mirceno em GC-MS e com temperatura entre 50 e 70 °C foi onde se iniciou o equilíbrio térmico, sendo desta forma a faixa de temperatura definida. Quanto ao tempo de equilíbrio, Su e Yin (2021) [214] aplicaram 10 min, e para analisar a presença de equilíbrio no método apresentado neste capítulo optou-se por tempos entre 10 e 30 min. Já para o tempo de sorção e exposição da fibra, a escolha da faixa de tempo foi baseada no trabalho de Van Opstaele e colaboradores (2012) [215] com valores entre 30 e 50 min. Para a melhor construção dos modelos foram utilizados erro puro e interações bidirecionais.

A tabela ANOVA foi construída para determinação da eficiência dos modelos com os valores de coeficiente de determinação (R^2) e p-valor de falta de ajuste apresentados na **Tabela 5.3**. O ajuste dos modelos teve resultados satisfatórios com p-valor da falta de ajuste maior que 0,05 e coeficientes de determinação próximos a 1. O menor valor de R^2 (0,8770) foi para a cetona 2-undecanona mas ainda assim com boa representatividade para o modelo.

Figura 5.4: Gráficos de equilíbrio de extração de voláteis em lúpulo Cascade por HS-SPME-GC×GC-MS com massa de lúpulo (eixo x) versus área de cada analito corrigida pelo padrão interno (IS) para compostos representativos das 7 classes presentes em lúpulos (n=3).

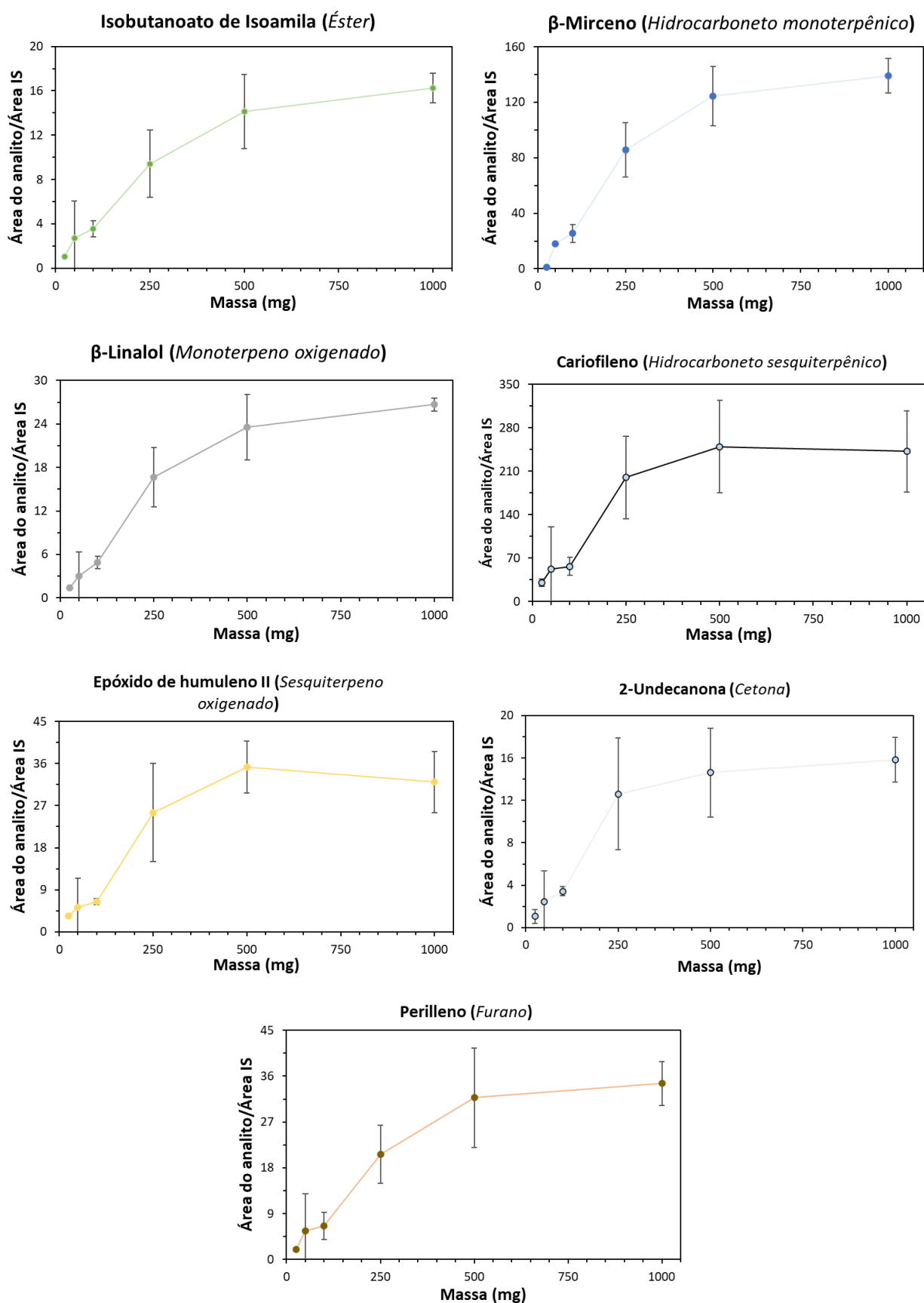


Tabela 5.3: Informações sobre os planejamentos BBD para 7 compostos de diferentes classes em lúpulo Cascade com a descrição dos RI reportados na literatura e experimentalmente, coeficiente de determinação (R^2) e p-valor da falta de ajuste determinados por ANOVA.

No.	Composto	Classe ^a	Lit. RI ^b	Exp. RI ^c	R^2	p-valor da falta de ajuste
1	β -Mirceno	HidM	991 $\pm$ 2	988	0,9850	0,1276
2	Isobutanoato de isoamila	Est	1015 $\pm$ 3	1014	0,9919	0,4209
3	Perileno	Fur	1101 $\pm$ 2	1098	0,9704	0,4153
4	β -Linalol	MO	1099 $\pm$ 2	1100	0,9819	0,1972
5	2-Undecanona	Cet	1294 $\pm$ 2	1292	0,8770	0,1789
6	Cariofileno	HidS	1419 $\pm$ 3	1426	0,9496	0,1243
7	Epóxido de humuleno II	SO	1606 $\pm$ 2	1613	0,9835	0,4900

^a HidM- Hidrocarbonetos monoterpênicos; Est- Ésteres; Fur- Furanos; MO- Monoterpenos oxigenados; Cet- Cetonas; HidS- Hidrocarbonetos sesquiterpênicos; SO- Sesquiterpenos oxigenados.

^b Índice de retenção (RI) para colunas 5% fenil com informações pela biblioteca NIST11 $\pm$ desvio padrão.

^c Índice de retenção calculado pela equação de Van den Dool e Kratz.

Subsequentemente, os gráficos de Pareto foram construídos (**Figura 5.5**) e verificados os fatores significativos para cada analito. A temperatura foi o fator mais significativo em todos os compostos, em que o fator tempo não foi tão significativo. Com exceção do epóxido de humuleno II, a temperatura teve influência negativa, onde o aumento da temperatura reduziu a capacidade extrativa do SPME. Isso pode ter sido causado pela redução da sensibilidade da fibra, ou mesmo o aumento da extração de compostos com massas moleculares maiores como foi o caso dos sesquiterpenos oxigenados. Por outro lado, o tempo de equilíbrio e sorção tiveram baixa significância o que pode remeter ao equilíbrio atingido pelo sistema de extração.

Para uma melhor análise dos dados, a metodologia de superfície de respostas (MSR) foi empregada para as interações de maior significância (**Figura 5.6**). Novamente foi demonstrado que a temperatura foi o fator de maior importância na extração dos compostos, e fica evidente que para epóxido de humuleno II, quanto maior a temperatura melhor a extração. Assim, com estes resultados escolheu-se manter a temperatura de 50 °C durante o aquecimento já que é a condição ótima de 6 classes, e optou-se pelo menor tempo de equilíbrio (10 min) e sorção (30 min) para eficiência nas análises.

Figura 5.5: Gráficos de Pareto de voláteis em lúpulo Cascade por HS-SPME-GC×GC-MS com efeito estimado padronizado (Valor absoluto) para compostos representativos das 7 classes presentes em lúpulos.

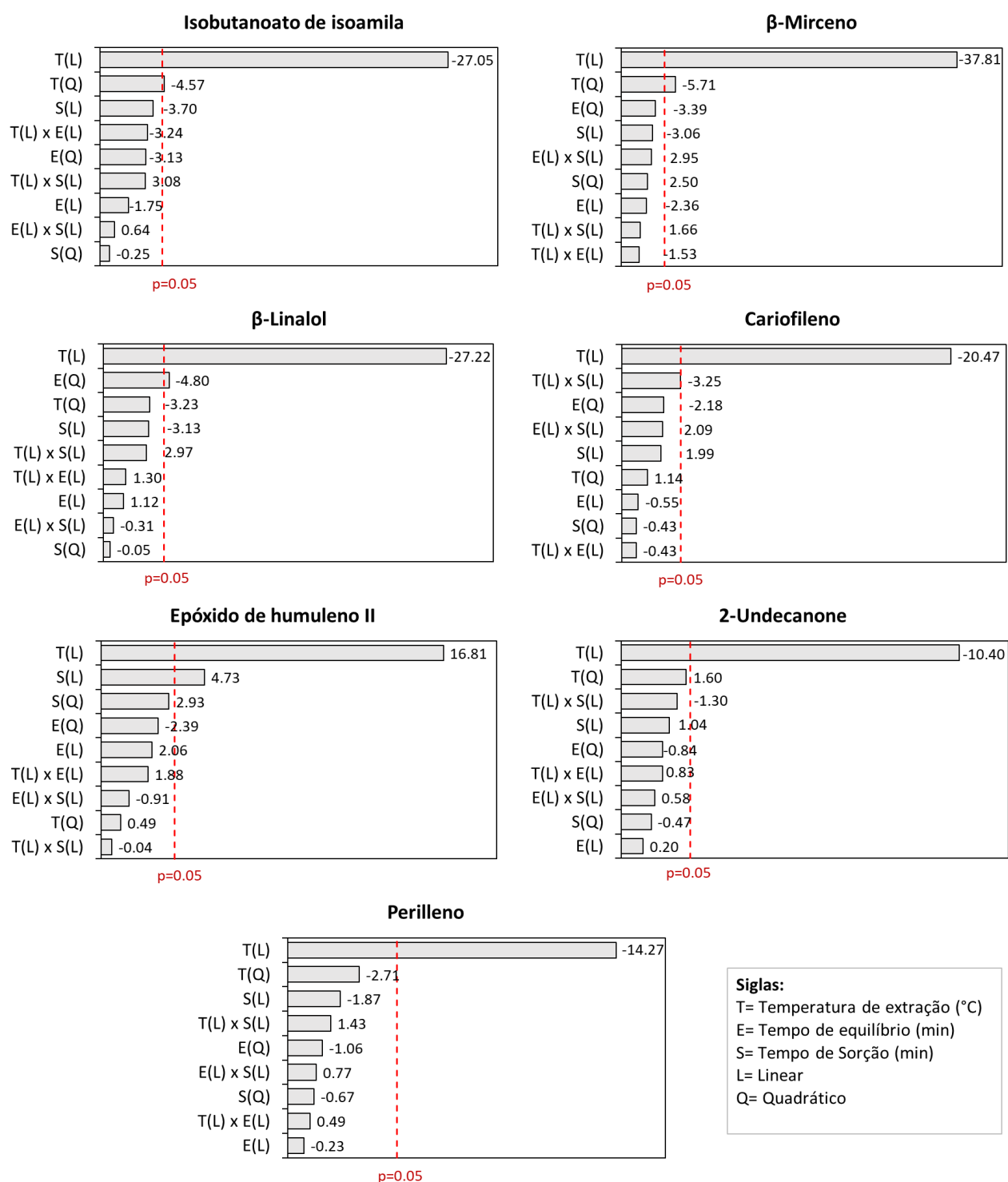
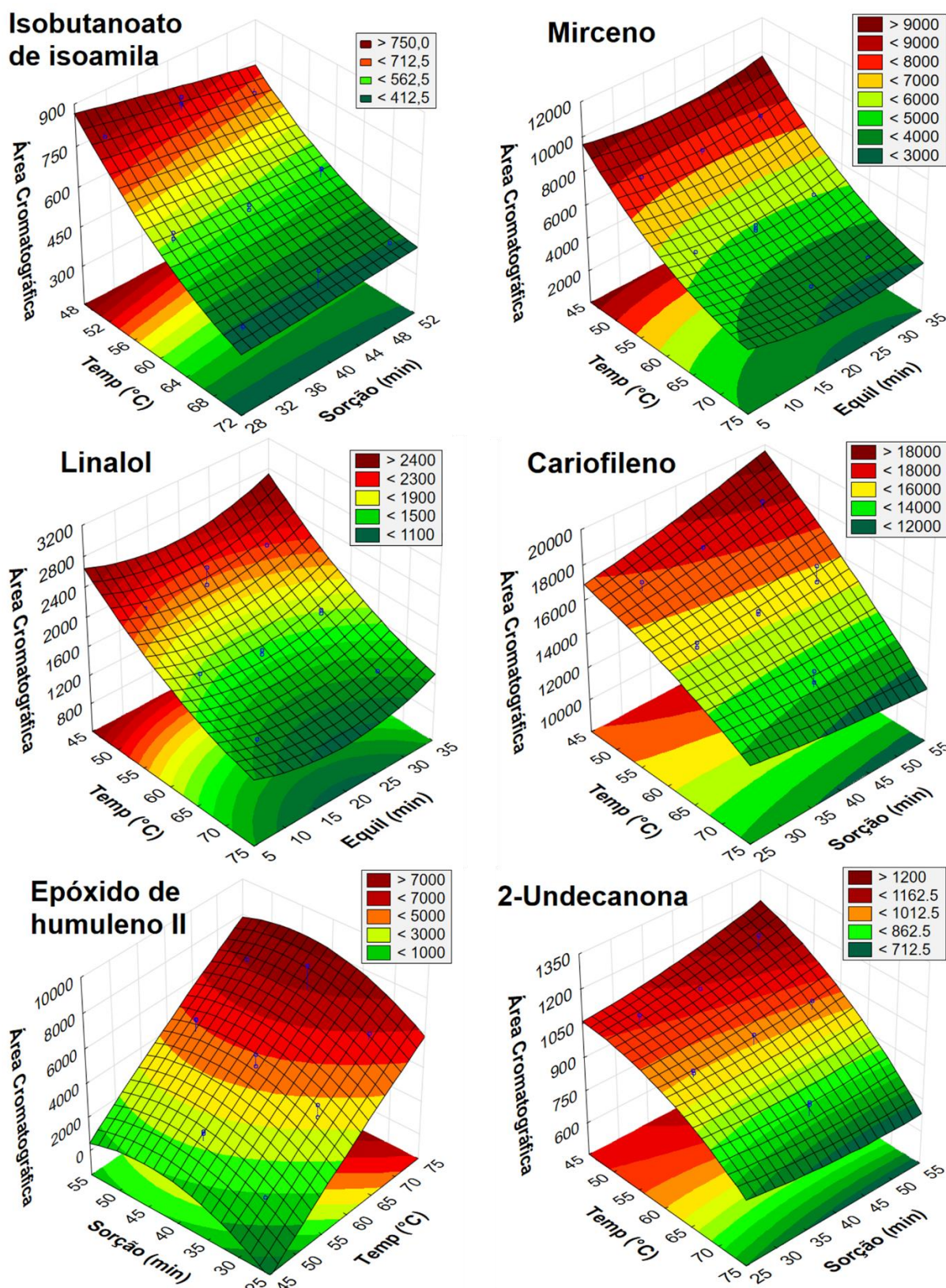


Figura 5.6: Superfícies de resposta para o planejamento BBD com os 2 fatores mais significativos pelo gráfico de Pareto para os compostos Isobutanoato de isoamila, Mirceno, Linalol, Cariofileno, Epóxido de humuleno II e 2-Undecanona em amostra de lúpulo Cascade.



5.3.2 Determinação do perfil de voláteis em lúpulos

A precisão intra e inter-dias foi avaliada usando lúpulo Cascade com HS-SPME-GC×GC-MS, selecionado para 22 compostos aleatórios e apresentado na **Tabela A.23**. A precisão intra-dia ($n = 5$ e injeções no mesmo dia) exibiu (% RSD de tempo de retenção de 0,00-0,23% para ^1t_R , 0,05-4,30% para ^2t_R e entre 1,51% e 9,63% para áreas de pico. A precisão inter-dia foi analisada com $n = 9$, onde 3 replicatas foram injetadas diariamente ao longo de 3 dias diferentes com resultados de 0,22-0,58% para ^1t_R , 1,21-8,77% para ^2t_R e 1,65%-12,81% para a área. Esses resultados indicam uma repetibilidade aceitável para o método proposto, em comparação com os valores de Yan et al. [103], o que significa um baixo valor de RSD, mesmo considerando a capacidade de reprodutibilidade do SPME.

Em comparação com estudos anteriores (**Tabela 2.7**, p.59), a metodologia atual resultou no maior número de picos tentativamente identificados no lúpulo usando GC×GC-MS. O perfil dos metabólitos apresentados nos 5 lúpulos identificou diversos picos por GC×GC-MS, totalizando 205 para AZAC, 258 para CASC, 421 para LORA, 472 para ZAPP e 413 para ENIG. Ao comparar o número de compostos relatados com GC-MS nas amostras (**Tabela 5.4**), comprovou-se a melhoria na cobertura metabólica por GC×GC-MS, com aumentos de 140,2% para CASC, 273,5% para ENIG e 316,8% para ZAPP. Na **Figura 5.2** (consulte **Figura A.25** e **Figura A.26** para as outras amostras) são representados os picos alinhados com 7 metabólitos que têm características significativas para o sabor e odor do lúpulo: (a) β -pineno, (b) β -mirceno, (c) isobutirato de 2-metilbutil, (d) linalol, (e) geraniol, (f) cariofileno e (g) humuleno.

Todos esses componentes agora parecem estar livres de interferência, embora os compostos não polares possam potencialmente levar a sobreposição de compostos. Uma melhor separação é obtida com uma correspondência aprimorada em bancos de dados de espectrometria de massas. Os resultados gerais demonstram evidências de uma melhor separação, distinção clara de compostos e, conseqüentemente, um aumento nos picos identificados.

Tabela 5.4: Comparação de picos de 3 amostras de lúpulo (CASC, ENIG e ZAPP) por GC–MS e GC×GC–MS.

Amostras	No. de picos por GC–MS		No. de picos por GC×GC–MS	
	<i>Integrados</i>	<i>Identificados</i>	<i>Integrados</i>	<i>Identificados</i>
CASC	184	45	258	67
ENIG	151	51	413	71
ZAPP	149	51	472	81

A identificação tentativa foi realizada utilizando o banco de dados NIST 11, e a identidade do composto de maior probabilidade foi determinada considerando o RMatch do MS (>700) e os índices de retenção (± 20 unidades) com base na equação de Van Den Dool e Kratz (**Tabela A.24**, **Figura A.23** e **Figura A.24**). Um total de 137 compostos foi identificado com a análise de GC×GC–MS em 5 variedades de lúpulo, e um total de 73 compostos na análise de GC–MS em 3 variedades de lúpulo (n=3, **Tabela A.25**).

A lista final de compostos identificados tentativamente por GC×GC–MS (**Tabela 5.5**) inclui sua fórmula molecular, identificador CAS, tempo de retenção, índices de retenção da literatura e experimental, a área cromatográfica relativa dos picos em cada amostra e a classe química do composto. Análises de alguns padrões analíticos selecionados foram realizadas para confirmação da identificação de compostos específicos. As principais classes de voláteis identificados e o número de compostos foram os seguintes: álcoois (3), aldeídos (4), ésteres (47), hidrocarbonetos (7), cetonas (9), hidrocarbonetos monoterpênicos (17), monoterpênicos oxigenados (12), hidrocarbonetos sesquiterpênicos (32) e sesquiterpênicos oxigenados (3).

Tabela 5.5: Informação da composição do perfil de lúpulo usando HS–SPME–GC×GC–MS

No.	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Composto*	Classe ^a	CAS	Fórmula	Lit. RI ^b	Exp. RI ^c	Área cromatográfica relativa do GC×GC (%)				
									AZAC	CASC	ENIG	LORA	ZAPP
1	8,86	1,28	Hexanal	Ald	66-25-1	C ₆ H ₁₂ O	800±2	800	0,005	0,015	ND	0,009	0,002
2	10,86	0,90	Isobutirato de propila	Est	644-49-5	C ₇ H ₁₄ O ₂	842±6	848	ND	ND	0,005	ND	0,002
3	11,36	0,99	Propionato de isobutila	Est	540-42-1	C ₇ H ₁₄ O ₂	866±2	859	ND	ND	ND	ND	0,011
4	11,66	1,21	Etilbenzeno	Hid	100-41-4	C ₈ H ₁₀	855±10	867	ND	ND	ND	0,004	ND
5	11,86	1,16	Acetato de 2-metilbutila	Est	624-41-9	C ₇ H ₁₄ O ₂	880±3	871	ND	ND	0,007	ND	0,046
6	13,66	0,93	Isobutirato de isobutila	Est	97-85-8	C ₈ H ₁₆ O ₂	910±4	912	0,025	0,032	0,352	ND	0,695
7	14,06	1,36	Hexanoato de metila	Est	106-70-7	C ₇ H ₁₄ O ₂	925±3	920	0,023	0,019	ND	0,008	0,030
8	14,16	0,71	(<i>E</i>)-1,3-Nonadieno	Hid	56700-77-7	C ₉ H ₁₆	924±0	922	ND	ND	0,015	ND	ND
9	14,36	0,67	α-Tujeno	HidM	2867-05-2	C ₁₀ H ₁₆	929±2	927	0,023	0,044	0,006	0,037	ND
10	14,66	0,67	α-Pineno ^d	HidM	80-56-8	C ₁₀ H ₁₆	937±3	933	0,037	0,147	0,106	0,017	0,267
11	14,76	1,93	4-metil-3-pentenoato de metila	Est	2258-65-3	C ₇ H ₁₄ O ₂	NA	935	0,023	ND	ND	ND	ND
12	15,36	1,01	Butirato de isobutila	Est	539-90-2	C ₈ H ₁₆ O ₂	955±6	947	ND	ND	0,004	0,002	0,012
13	15,36	4,09	5,5-dimetil-2(5 <i>H</i>)-furanona	Out	20019-64-1	C ₆ H ₈ O ₂	952±5	947	ND	0,086	ND	ND	ND
14	15,56	0,72	Canfeno ^d	HidM	79-92-5	C ₁₀ H ₁₆	952±2	951	ND	0,060	0,003	0,014	ND
15	16,06	5,67	Benzaldeído	Ald	100-52-7	C ₇ H ₆ O	962±3	961	ND	ND	ND	0,003	ND
16	16,46	1,14	Propionato de 2-metilbutila	Est	2438-20-2	C ₈ H ₁₆ O ₂	970±4	969	0,010	ND	0,081	0,051	0,706
17	16,66	0,84	β-Tujeno	HidM	28634-89-1	C ₁₀ H ₁₆	966±12	973	ND	0,006	ND	ND	ND
18	16,96	0,76	β-Pineno ^d	HidM	127-91-4	C ₁₀ H ₁₆	979±2	980	0,041	0,238	0,085	0,057	1,154
19	17,16	2,05	6-metil-5-hepteno-2-ona	Cet	110-93-0	C ₈ H ₁₄ O	986±2	984	0,027	0,206	ND	0,077	0,022
20	17,16	1,25	Isoeptanoato de metila	Est	2177-83-5	C ₈ H ₁₆ O ₂	993±NA	984	ND	ND	ND	ND	0,035
21	17,36	1,64	2-Octanona	Ket	111-13-7	C ₈ H ₁₆ O	990±7	988	0,030	ND	ND	ND	ND
22	17,36	0,98	β-Mirceno ^d	HidM	123-35-3	C ₁₀ H ₁₆	991±2	988	0,907	5,931	37,817	2,632	17,065
23	17,46	0,57	2,2,4,6,6-pentametileptano	Hid	13475-82-6	C ₁₂ H ₂₆	991±4	990	ND	0,045	ND	ND	ND
24	17,76	1,18	Hexanoato de etila ^d	Est	123-66-0	C ₈ H ₁₆ O ₂	1000±2	996	ND	ND	ND	0,003	ND
25	18,06	0,97	2-metilbutanoato de isobutila	Est	2445-67-2	C ₉ H ₁₈ O ₂	1004±4	1002	0,010	0,003	0,060	0,005	0,031
26	18,26	1,06	Isovalerato de isobutila	Est	589-59-3	C ₉ H ₁₈ O ₂	1005±2	1006	ND	0,020	0,012	0,003	0,046
27	18,26	0,85	α-Felandreno	HidM	99-83-2	C ₁₀ H ₁₆	1005±2	1006	ND	ND	0,016	ND	ND

No.	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Composto*	Classe ^a	CAS	Fórmula	Lit. RI ^b	Exp. RI ^c	Área cromatográfica relativa do GC×GC (%)				
									AZAC	CASC	ENIG	LORA	ZAPP
28	18,46	0,94	Isobutanoato de isoamila	Est	2050-01-3	C ₉ H ₁₈ O ₂	1015±3	1010	ND	ND	0,222	0,503	ND
29	18,66	1,01	Isobutirato de 2-metilbutila	Est	2445-69-4	C ₉ H ₁₈ O ₂	1016±2	1014	2,184	0,599	2,185	0,738	7,530
30	19,06	1,40	Heptanoato de metila	Est	106-73-0	C ₈ H ₁₆ O ₂	1023±3	1022	0,127	0,061	0,024	ND	0,122
31	19,16	2,43	o-Cimeno	HidM	527-84-4	C ₁₀ H ₁₄	1022±2	1023	0,007	ND	ND	0,012	0,014
32	19,26	1,64	3-metil-3-hexenoato de metila	Est	50652-84-1	C ₈ H ₁₄ O ₂	NA	1025	0,221	ND	ND	ND	ND
33	19,26	1,25	p-Cimeno	HidM	99-87-6	C ₁₀ H ₁₄	1025±2	1025	0,103	0,284	0,008	0,146	0,156
34	19,46	0,98	D-Limoneno ^d	HidM	5989-27-5	C ₁₀ H ₁₆	1030±2	1029	0,229	1,103	0,304	0,497	0,699
35	19,66	0,98	β-Ocimeno	HidM	13877-91-3	C ₁₀ H ₁₆	1037±7	1033	ND	ND	0,078	ND	0,026
36	20,26	1,05	trans-β-Ocimeno	HidM	3779-61-1	C ₁₀ H ₁₆	1049±2	1045	ND	ND	2,806	ND	0,394
37	20,36	1,01	Isobutirato de pentila	Est	2445-72-9	C ₉ H ₁₈ O ₂	1056±1	1047	ND	ND	ND	0,007	ND
38	20,46	1,31	Isobutirato de prenila	Est	76649-23-5	C ₉ H ₁₆ O ₂	1052±1	1049	ND	ND	ND	0,007	0,871
39	20,66	1,25	Isobutirato de (E)-2-metilbutil-2-en-1-ila	Est	95654-17-4	C ₉ H ₁₆ O ₂	1059±NA	1053	ND	ND	0,041	ND	0,048
40	20,66	0,61	9-metil-1-deceno	Hid	61142-78-7	C ₁₁ H ₂₂	1055±NA	1053	ND	ND	ND	ND	0,011
41	20,76	1,06	Butanoato de 2-metilbutila	Est	51115-64-1	C ₉ H ₁₈ O ₂	1056±3	1055	ND	ND	ND	ND	0,011
42	20,86	0,97	γ-Terpineno	HidM	99-85-4	C ₁₀ H ₁₆	1060±3	1057	ND	ND	0,015	ND	0,023
43	20,86	1,14	2-metileptanoato de metila	Est	51209-78-0	C ₉ H ₁₈ O ₂	1067±NA	1057	ND	ND	ND	ND	0,010
44	21,66	2,15	Óxido de linalol (cis)	MO	5989-33-3	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1074±4	1073	ND	0,022	ND	0,006	ND
45	22,26	1,00	Isoterpinoleno	HidM	586-63-0	C ₁₀ H ₁₆	1086±3	1084	ND	ND	0,015	ND	0,028
46	22,26	1,29	6-metileptanoato de metila	Est	2519-37-1	C ₉ H ₁₈ O ₂	NA	1084	ND	ND	ND	0,020	1,968
47	22,46	2,22	Óxido de linalol (trans)	MO	34995-77-2	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1086±5	1088	ND	0,036	ND	0,010	ND
48	22,56	1,63	2-Nonanona	Cet	821-55-6	C ₉ H ₁₈ O	1092±2	1090	0,508	0,022	ND	0,028	0,085
49	22,86	1,24	Heptanoato de etila	Est	106-30-9	C ₉ H ₁₈ O ₂	1097±3	1096	0,012	ND	ND	0,016	ND
50	22,96	2,54	2-Nonanol	Alc	628-99-9	C ₉ H ₂₀ O	1102±4	1098	ND	ND	0,029	0,125	ND
51	22,96	4,19	Isomircenol	MO	6994-89-4	C ₁₀ H ₁₆ O	NA	1098	ND	0,062	ND	ND	ND
52	22,96	1,71	Perilleno	HidM	539-52-6	C ₁₀ H ₁₄ O	1101±2	1098	0,185	1,432	0,035	0,309	0,640
53	23,06	1,43	Hop éter	Out	344294-72-0	C ₁₀ H ₁₆ O	NA	1100	0,063	0,199	ND	0,089	0,232
54	23,06	2,91	Linalol ^d	MO	78-70-6	C ₁₀ H ₁₈ O	1099±2	1100	0,635	1,376	0,141	1,952	0,979
55	23,16	1,05	2-metilbutoanato de 2-metilbutila	Est	2445-78-5	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1105±2	1102	0,077	0,052	0,169	0,068	0,140
56	23,16	1,18	Propanoato de hexila	Est	2445-76-3	C ₉ H ₁₈ O ₂	1108±6	1102	ND	ND	ND	0,017	ND
57	23,46	1,07	Isovalerato de 2-metilbutila	Est	2445-77-4	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1107±2	1108	0,214	0,197	0,086	0,128	0,255

No.	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Composto*	Classe ^a	CAS	Fórmula	Lit. RI ^b	Exp. RI ^c	Área cromatográfica relativa do GC×GC (%)				
									AZAC	CASC	ENIG	LORA	ZAPP
58	24,06	2,95	Fenchol	MO	1632-73-1	C ₁₀ H ₁₈ O	1113±4	1120	ND	ND	ND	0,003	ND
59	24,16	1,38	Octanoato de metila	Est	111-11-5	C ₉ H ₁₈ O ₂	1126±2	1122	0,067	0,034	0,043	0,057	0,142
60	24,36	1,21	Neo-allo-ocimeno	HidM	7216-56-0	C ₁₀ H ₁₆	1131±0	1126	ND	ND	0,005	ND	ND
61	24,96	1,28	(4E,6E)-Allocimeno	HidM	3016-19-1	C ₁₀ H ₁₆	1144±1	1138	ND	ND	0,020	ND	ND
62	25,26	1,38	Pivalato de 3-metilbut-2-en-1-ilo	Est	211429-71-9	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	1141±NA	1144	ND	ND	ND	ND	0,010
63	25,36	1,14	Isobutirato de hexila	Est	2349-07-7	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1150±2	1146	0,081	0,001	0,095	0,156	ND
64	27,46	1,34	6-metiloctanoato de metila <i>Methyl 6-methyloctanoate</i>	Est	5129-62-4	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1193±5	1188	ND	ND	ND	ND	0,749
65	27,56	1,64	2-Decanona	Cet	693-54-9	C ₁₀ H ₂₀ O	1193±2	1190	0,489	0,078	ND	0,032	0,182
66	27,76	1,26	Octanoato de etila	Est	106-32-1	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1196±3	1194	0,007	ND	ND	0,026	ND
67	27,76	3,27	α-Terpinol	MO	98-55-5	C ₁₀ H ₁₈ O	1189±2	1194	ND	ND	ND	0,012	ND
68	27,96	2,29	2-Decanol	Alc	1120-06-5	C ₁₀ H ₂₂ O	1200±7	1198	ND	ND	0,018	0,115	ND
69	27,96	0,60	Dodecano	Hid	112-40-3	C ₁₂ H ₂₆	1200±NA	1198	ND	ND	ND	0,012	ND
70	28,06	1,20	Propanoato de heptila	Est	2216-81-1	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1201±NA	1200	ND	ND	0,003	0,020	ND
71	28,96	1,36	Nonanoato de metila	Est	1731-84-6	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	1225±2	1219	ND	ND	0,012	0,015	0,018
72	30,06	1,08	Isobutirato de heptila	Est	2349-13-5	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	1247±1	1243	ND	ND	0,050	0,233	ND
73	30,36	4,78	Geraniol ^d	MO	106-24-1	C ₁₀ H ₁₈ O	1255±3	1249	0,034	0,893	0,027	0,054	0,066
74	30,46	1,19	Hexanoato de 2-metilbutila	Est	2601-13-0	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	1247±1	1251	0,012	0,017	0,017	ND	0,011
75	31,16	2,76	α-Citral	MO	141-27-5	C ₁₀ H ₁₆ O	1270±2	1266	ND	ND	ND	0,010	ND
76	31,66	1,89	(Z)-Undec-6-en-2-ona	Cet	107853-70-3	C ₁₁ H ₂₀ O	1274±NA	1277	0,271	0,148	0,028	0,089	0,122
77	31,66	3,28	Perilaldeído	Ald	2111-75-3	C ₁₀ H ₁₄ O	1272±4	1277	ND	ND	ND	0,011	ND
78	31,96	1,34	8-Metilnonanoato de metila	Est	5129-54-4	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	1277±NA	1283	ND	ND	0,007	ND	0,350
79	32,36	1,64	2-Undecanona	Cet	112-12-9	C ₁₁ H ₂₂ O	1294±2	1291	1,935	0,669	0,293	1,244	0,731
80	32,76	2,21	2-Undecanol	Alc	1653-30-1	C ₁₁ H ₂₄ O	1307±4	1300	ND	ND	0,049	0,460	ND
81	32,76	1,24	Propionato de n-octila	Est	142-60-9	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	1302±NA	1300	ND	ND	ND	0,048	ND
82	33,06	1,65	(Z)-4-decenoato de metila	Est	7367-83-1	C ₁₁ H ₂₀ O ₂	NA	1307	0,108	0,037	0,471	0,956	2,256
83	33,66	1,40	Decanoato de metila	Est	110-42-9	C ₁₁ H ₂₂ O ₂	1325±1	1320	ND	ND	0,014	ND	0,034
84	33,66	2,00	<i>trans</i> -Geraniato de metila	MO	1189-09-9	C ₁₁ H ₁₈ O ₂	1324±2	1320	0,251	0,438	0,403	1,785	0,262
85	34,66	1,14	Isobutirato de n-octila	Est	109-15-9	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1346±3	1342	0,022	ND	0,052	0,537	ND
86	34,96	1,18	Heptanoato de isopentila	Est	109-25-1	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	1334±1	1349	0,013	ND	0,015	ND	ND
87	35,06	0,94	α-Cubeneno	HidS	17699-14-8	C ₁₅ H ₂₄	1351±2	1351	0,024	0,014	ND	0,009	0,060

No.	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Composto*	Classe ^a	CAS	Fórmula	Lit. RI ^b	Exp. RI ^c	Área cromatográfica relativa do GC×GC (%)				
									AZAC	CASC	ENIG	LORA	ZAPP
88	35,26	1,05	Isobutirato de 1-metiloctila	Est	69121-76-2	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	1365±NA	1356	0,012	ND	ND	0,017	ND
89	35,26	1,58	2-metil-1-undecanal	Ald	110-41-8	C ₁₂ H ₂₄ O	1365±2	1356	0,024	0,022	ND	ND	0,063
90	36,06	1,01	Ylangeno	HidS	14912-44-8	C ₁₅ H ₂₄	1372±2	1373	0,680	0,377	0,141	0,398	0,218
91	36,16	1,94	Acetato de geranil ^d	MO	105-87-3	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1382±3	1376	0,016	0,086	ND	0,016	0,233
92	36,26	1,48	(Z)-4-decanoato de etila	Est	7367-84-2	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	1361±2	1378	0,025	ND	ND	0,065	ND
93	36,36	1,06	Copaeno	HidS	3856-25-5	C ₁₅ H ₂₄	1376±2	1380	2,623	1,643	0,567	1,595	0,739
94	36,66	1,02	β-Bourboneno	HidS	5208-59-3	C ₁₅ H ₂₄	1384±3	1387	ND	ND	ND	0,027	ND
95	36,76	1,08	α-Bourboneno	HidS	5208-58-2	C ₁₅ H ₂₄	1384±8	1389	ND	0,011	ND	ND	ND
96	36,96	1,67	2-Dodecanona	Cet	6175-49-1	C ₁₂ H ₂₄ O	1396±9	1393	0,200	0,056	0,011	0,148	0,159
97	37,16	1,06	(+)-Sativeno	HidS	3650-28-0	C ₁₅ H ₂₄	1396±0	1398	0,047	0,022	0,005	0,025	ND
98	37,16	0,72	Tetradecano	Hid	629-59-4	C ₁₄ H ₃₀	1400±NA	1398	ND	ND	ND	0,011	ND
99	37,66	0,97	1,3-dimetil-5-n-propil-adamantano	Hid	19385-87-6	C ₁₅ H ₂₆	NA	1409	0,029	ND	ND	0,015	0,008
100	37,66	1,14	Isocarofileno	HidS	118-65-0	C ₁₅ H ₂₄	1406±3	1410	0,029	0,036	ND	0,021	0,059
101	37,76	1,64	Undecenoato de metila	Est	111-81-9	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	1427±2	1412	ND	ND	ND	ND	0,011
102	37,96	1,06	cis-α-Bergamoteno	HidS	18252-46-5	C ₁₅ H ₂₄	1415±3	1417	ND	0,040	ND	ND	ND
103	38,36	1,32	Cariofileno ^d	HidS	87-44-5	C ₁₅ H ₂₄	1419±3	1426	21,711	13,191	8,484	15,606	20,439
104	38,76	1,14	β-Copaeno	HidS	13744-15-5	C ₁₅ H ₂₄	1432±3	1436	0,417	ND	0,022	0,368	0,443
105	38,76	1,12	α-Bergamoteno	HidS	17699-05-7	C ₁₅ H ₂₄	1435±4	1436	ND	2,169	0,929	ND	0,007
106	39,16	1,21	Octanoato de 2-metilbutila	Est	67121-39-5	C ₁₃ H ₂₆ O ₂	1449±2	1445	ND	ND	0,020	0,009	0,007
107	39,46	1,28	(E)-β-Farneseno	HidS	28973-97-9	C ₁₅ H ₂₄	1457±2	1452	ND	1,091	9,024	ND	ND
108	39,86	1,50	Humuleno ^d	HidS	6753-98-6	C ₁₅ H ₂₄	1454±3	1462	41,362	36,442	16,036	54,069	10,053
109	39,96	1,73	Propionato de geranila	MO	105-90-8	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	1475±3	1464	ND	ND	ND	ND	0,282
110	40,46	1,32	7-epi-α-Cadineno	HidS	483-75-0	C ₁₅ H ₂₄	1485±10	1476	ND	ND	ND	2,104	ND
111	40,46	1,33	γ-Selineno	HidS	515-17-3	C ₁₅ H ₂₄	1479±6	1476	ND	ND	1,369	ND	ND
112	40,56	1,36	γ-Muroleno	HidS	30021-74-0	C ₁₅ H ₂₄	1477±3	1479	4,510	3,129	ND	ND	2,218
113	40,76	1,56	α-Curcumeneno	HidS	644-30-4	C ₁₅ H ₂₂	1483±3	1483	ND	0,090	ND	ND	ND
114	40,96	1,24	(Z,E)-α-Farneseno	HidS	26560-14-5	C ₁₅ H ₂₄	1491±3	1488	ND	0,040	0,045	ND	ND
115	41,16	1,35	Eremofileno	HidS	10219-75-7	C ₁₅ H ₂₄	1499±8	1493	0,086	ND	ND	ND	ND
116	41,16	1,68	2-Tridecanona	Cet	593-08-8	C ₁₃ H ₂₆ O	1497±4	1493	0,452	0,146	0,022	0,415	0,066
117	41,26	1,48	β-Eudesmeno	HidS	17066-67-0	C ₁₅ H ₂₄	1486±3	1495	1,733	3,842	5,830	1,045	2,432

No.	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Composto*	Classe ^a	CAS	Fórmula	Lit. RI ^b	Exp. RI ^c	Área cromatográfica relativa do GC×GC (%)				
									AZAC	CASC	ENIG	LORA	ZAPP
118	41,46	1,37	α-Muuroleno	HidS	31983-22-9	C ₁₅ H ₂₄	1500±NA	1500	2,457	ND	ND	1,042	0,701
119	41,46	2,18	3,6-dodecadienoato de metila	Est	16106-01-7	C ₁₃ H ₂₂ O ₂	NA	1500	ND	ND	0,338	ND	0,548
120	41,56	1,45	α-Selineno	HidS	473-13-2	C ₁₅ H ₂₄	1494±3	1502	ND	3,506	0,405	ND	2,090
121	41,66	1,56	Isobutirato de geranila	MO	2345-26-8	C ₁₄ H ₂₄ O ₂	1514±2	1505	0,150	0,133	ND	0,085	3,761
122	41,86	1,29	β-Bisaboleno	HidS	495-61-4	C ₁₅ H ₂₄	1509±3	1510	ND	0,111	0,109	ND	ND
123	42,16	1,50	γ-Cadineno	HidS	39029-41-9	C ₁₅ H ₂₄	1513±2	1517	2,959	2,108	0,481	1,126	1,187
124	42,36	1,42	δ-Cadineno	HidS	483-76-1	C ₁₅ H ₂₄	1524±2	1522	3,685	1,261	0,937	1,974	1,463
125	42,46	1,70	Calameneno	HidS	483-77-2	C ₁₅ H ₂₂	1523±5	1525	0,863	0,572	0,045	0,458	0,314
126	42,56	1,36	Zonareno	HidS	41929-05-9	C ₁₅ H ₂₄	1527±NA	1527	0,256	0,059	0,128	0,094	0,055
127	42,86	1,39	Cadina-1,4-dieno	HidS	16728-99-7	C ₁₅ H ₂₄	1533±4	1535	ND	ND	0,149	ND	ND
128	43,06	1,47	α-Cadineno	HidS	24406-05-1	C ₁₅ H ₂₄	1538±1	1540	ND	0,205	ND	0,225	0,193
129	43,16	1,45	(4aR,8aS)-4a-metil-1-metileno-7-(propan-2-ilideno)decaidronaftaleno	HidS	58893-88-2	C ₁₅ H ₂₄	1544±NA	1542	0,970	ND	ND	ND	ND
130	43,26	1,97	α-Calacoreno	HidS	21391-99-1	C ₁₅ H ₂₀	1542±3	1545	0,151	0,079	0,011	0,065	0,058
131	43,36	1,45	Selina-3,7(11)-dieno	HidS	6813-21-4	C ₁₅ H ₂₄	1542±3	1547	0,345	ND	ND	ND	ND
132	44,16	1,87	(Z)-Tetradec-6-en-2-ona	Out	NA	C ₁₄ H ₂₆ O	1570±NA	1567	ND	ND	ND	0,031	0,047
133	45,06	2,19	Óxido de cariofileno ^d	SO	1139-30-6	C ₁₅ H ₂₄ O	1581±2	1590	0,593	0,431	ND	0,291	1,427
134	45,16	1,63	2-Tetradecanona	Ket	2345-27-9	C ₁₄ H ₂₈ O	1597±1	1593	ND	ND	ND	0,017	ND
135	45,66	2,28	Epóxido de humuleno I	SO	19888-33-6	C ₁₅ H ₂₄ O	1604±3	1605	0,120	0,245	ND	0,127	0,040
136	46,06	2,40	Epóxido de humuleno II	SO	19888-34-7	C ₁₅ H ₂₄ O	1606±2	1616	1,347	1,867	ND	1,254	0,549
137	47,56	2,16	Acetato de (E,Z)-5,7-dodecadien-1-ol	Est	78350-11-5	C ₁₄ H ₂₄ O ₂	1653±0	1657	ND	ND	ND	0,068	ND
Total									96,889	87,617	91,454	96,282	89,225

Abreviações: ¹t_R - Tempo de retenção na primeira dimensão; ²t_R - Tempo de retenção na segunda dimensão; RI - Índice de retenção; AZAC - Azacca; CASC - Cascade; ENIG - Enigma; LORA - Loral; ZAPP - Zappa; NA - Não aplicável ou não encontrado; ND - Não detectado.

*Identificação tentativa;

^a Classes: Alc - Álcool; Ald - Aldeído; Cet - Cetona; Est - Éster; Hid - Hidrocarboneto; HidM - Hidrocarboneto monoterpênico; HidS- Hidrocarboneto sesquiterpênico; MO - Monoterpeno oxigenado; SO - Sesquiterpeno oxigenado e Out - Outros

^b Lit. RI, índices de retenção da literatura para os compostos em uma coluna não polar "semi-standard", 5% de fenil usando a biblioteca NIST 11;

^c Exp. RI, índice de retenção experimental calculado pela equação de Van den Dol e Kratz;

^d Identificação confirmada por injeção de padrões.

A quantidade total de voláteis é expressa na última linha da tabela, demonstrando que ainda existe uma fração de compostos desconhecidos, variando de 3,11% a 12,38% da área total, que não puderam ser identificados. No entanto, essa é uma quantidade significativa de moléculas identificadas ou provisoriamente identificadas, uma vez que estudos como o de Wong, Perlmutter e Marriot [218] têm uma representação de 50,8-90,0% da amostra por GC×GC.

As principais áreas detectadas foram relatadas para a classe dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos: humuleno (**108**) e cariofileno (**103**) e ao hidrocarboneto monoterpênico β -mirceno (**22**), em que os números entre parênteses representam o No da **Tabela 5.5**. Esses três compostos são relatados na literatura como os principais componentes presentes no lúpulo, sendo responsáveis por até 90% da composição dos óleos essenciais dessa amostra [17]. Estas substâncias são formadas a partir de precursores obtidos por meio da via do 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfato (MEP), seguida pela transformação por preniltransferases em difosfato de geranila (GPP) [219,220].

O β -mirceno é formado por GPP durante o crescimento do lúpulo por uma *monoterpene sintase* (MTS2) [220,221] e possui características olfativas de pimenta, tempero, bálsamo, plástico e terpeno [109]. Para as amostras estudadas, a maior área de β -mirceno foi relatada para o lúpulo ENIG (37,82%), seguido por ZAPP (17,06%) e CASC (5,93%). O cariofileno, ou β -cariofileno, é um isômero do humuleno, também identificado como α -humuleno ou α -cariofileno, e ambos os compostos são produzidos pela *sesquiterpene sintase 1* (HISTS1) a partir do precursor β -farneseno formado após GPP [220,221].

O humuleno é um metabólito originado nas fases finais da maturação do cone de lúpulo e foi reportado nas amostras com a maior área de 54,07% para a amostra LORA, 41,36% para AZAC, 36,44% para CASC e as duas menores, mas ainda com uma porcentagem considerável, 16,04% para ENIG e 10,05% para ZAPP. O cariofileno apresentou concentrações mais baixas do que o humuleno nas amostras, exceto para ZAPP, que tinha o dobro de cariofileno em relação ao humuleno. Outro comportamento observado e confirmado em relação à literatura foi a relação entre β -mirceno e humuleno, onde o β -mirceno tem uma concentração inversamente relacionada a concentração do humuleno, descrito por um intermediário comum na biossíntese deles e de α -ácidos e β -ácidos [17,222].

Alguns compostos foram identificados em apenas uma das amostras, com possível utilização como marcadores químicos (**Tabela 5.6**), incluindo:

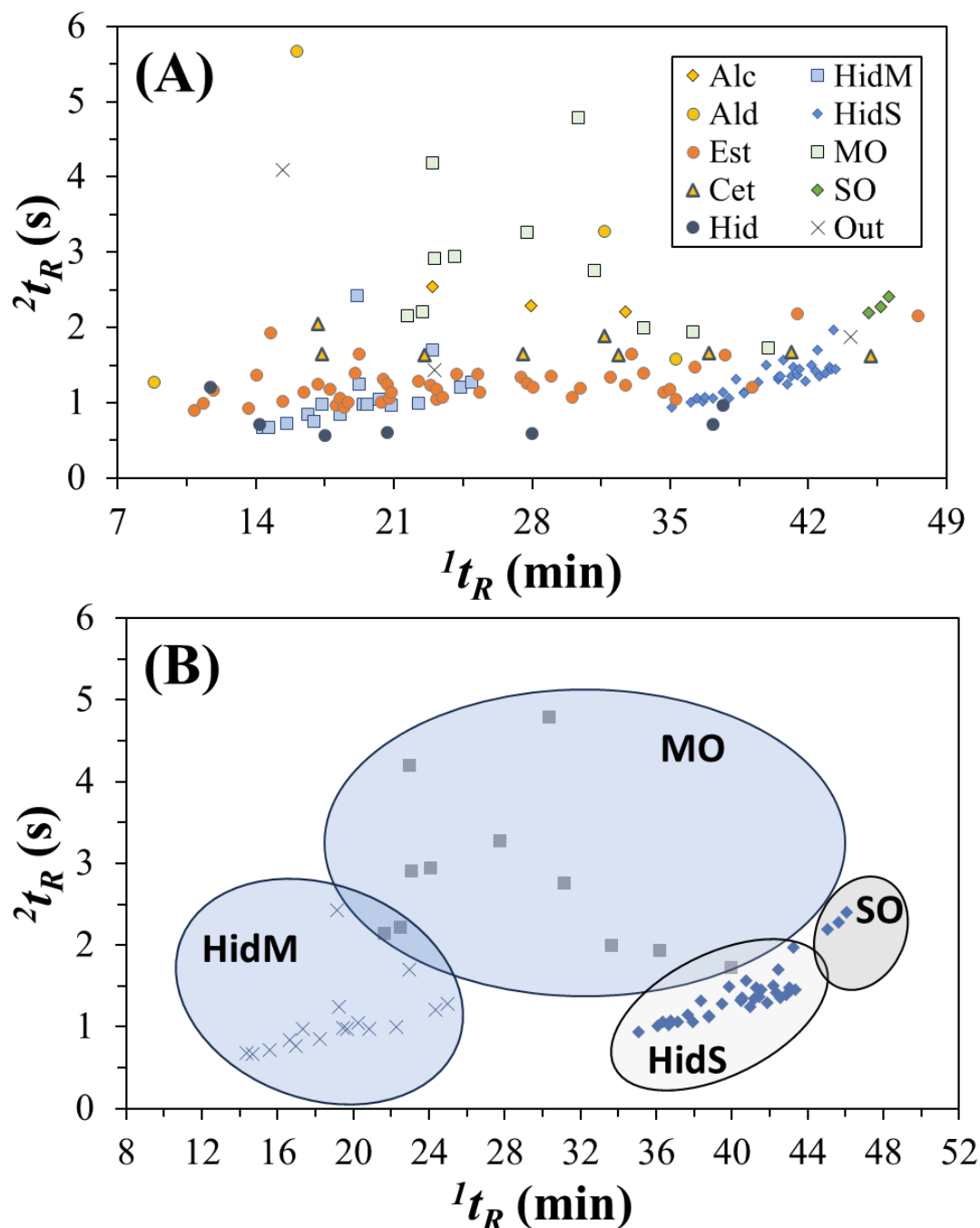
Tabela 5.6: Compostos encontrados exclusivamente em apenas uma das amostras de lúpulo.

Amostra	Composto (Número do pico)
AZAC	4-metil-3-pentenoato de metila (11), 2-octanona (21), 3-metil-3-hexenoato de metila (32), eremofileno (115), (4a <i>R</i> ,8a <i>S</i>)-4a-metil-1-metileno-7-(propan-2-ilideno) decaidronaftaleno (129)*, selina-3,7(11)-dieno (131);
CASC	4,4-dimetil-2-buten-4-olídeo (13), β -tujeno (17), 2,2,4,6,6-pentametilheptano (23), isomircenol (51), α -bourboneno (95), <i>cis</i> - α -bergamoteno (102), α -curcumeno (113);
ENIG	(<i>E</i>)-1,3-nonadieno (8), α -felandreno (27), neo-allo-ocimeno (60), (4 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-allocimeno (61), γ -selineno (111), cadina-1,4-dieno (127);
LORA	isobutirato de pentila (37), propanoato de hexila (56), fenchol (58), α -terpinol (67), dodecano (69), α -citral (75), perilaldeído (77), propionato de n-octila (81), β -bourboneno (94), tetradecano (98), 7-epi- α -cadineno (110), 2-tetradecanona (134), acetato de (<i>E,Z</i>)-5,7-dodecadien-1-ol (137);
ZAPP	propionato de isobutila (3), isoheptanoato de metila (20), 9-metil-1-deceno (40), butanoato de 2-metilbutila (41), 2-metileptanoato de metila (43), Pivalato de 3-metilbut-2-en-1-ilo (62), 6-metiloctanoato de metila (64), undecenoato de metila (101), propionato de geranila (109).

*Embora uma coluna enantiosseletiva não tenha sido utilizada e, portanto, a quiralidade de um composto não possa ser avaliada, esta foi a entrada retornada pela busca no banco de dados.

A elucidação da distribuição dos compostos tentativamente identificados em GC×GC pode ser expressa pelo diagrama de ápices (*apex plot*), **Figura 5.7a**, construído considerando todas as moléculas identificadas presentes na **Tabela 5.5**. As classes podem ser vistas como diferentes marcadores, onde a localização dos picos mostra uma região para várias classes. Por exemplo, ésteres (círculos laranja) persistem ao longo de toda a faixa de ^1t_R , mas se agrupam entre 1,0 e 2,0 s ^2t_R , e são mostrados acima dos hidrocarbonetos (círculo azul escuro). Os terpenos, **Figura 5.7b**, demonstram o poder de separação do GC×GC por meio de uma distinção clara entre as classes de hidrocarbonetos monoterpênicos (HidM), monoterpênos oxigenados (MO), hidrocarbonetos sesquiterpênicos (HidS) e sesquiterpenos oxigenados (SO).

Figura 5.7: Diagrama de ápices dos compostos presentes nas amostras de lúpulo AZAC, CASC, ENIG, LORA e ZAPP por classes (A) e com a separação de terpenos (B).

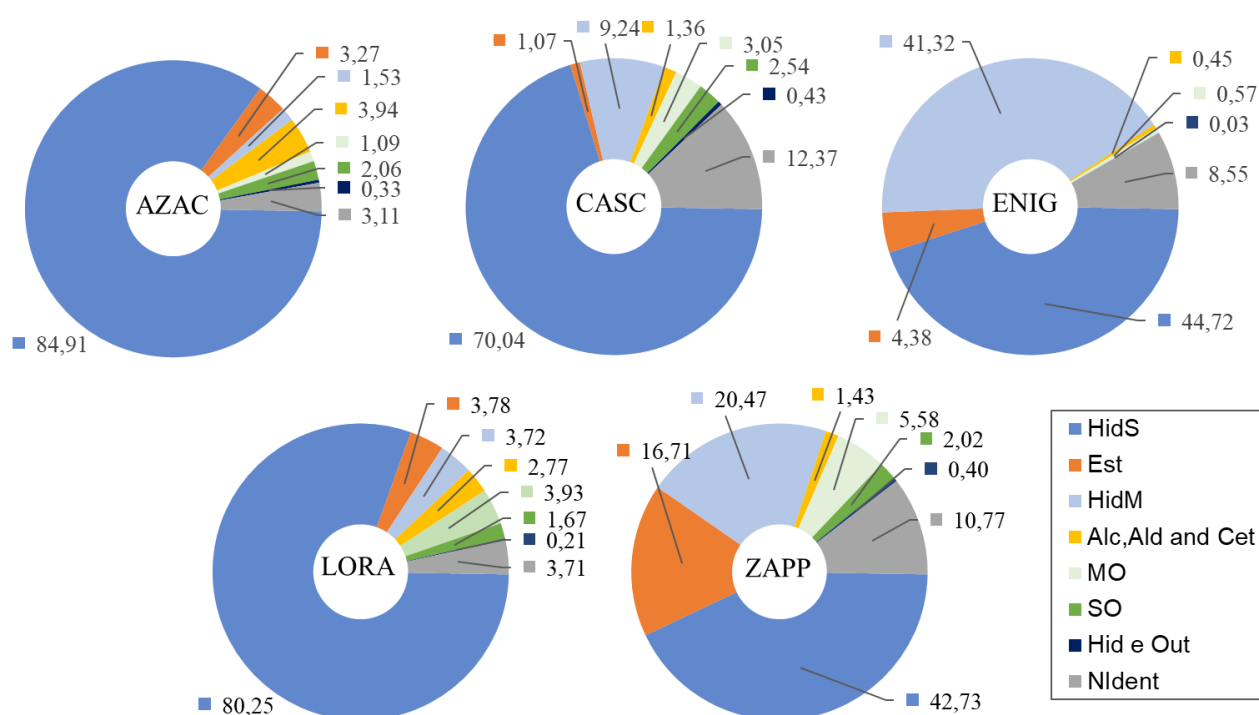


Alc - Álcool; Ald - Aldeído; Est - Éster; Hid - Hidrocarboneto; Cet - Cetona; HidM - Hidrocarboneto monoterpênico; MO - Monoterpeno oxigenado; HidS - Hidrocarboneto sesquiterpênico; SO - Sesquiterpeno oxigenado e Out – Outros

As classes de compostos representadas neste estudo podem ser consideradas descritoras da composição do lúpulo, exibindo a formação de metabólitos e a identidade do cone. A **Figura 5.8** representa o perfil composicional de cada lúpulo pelo percentual obtido por nossa metodologia (sujeito às limitações de relatar áreas de pico usando SPME), destacando claramente as diferenças entre as amostras. De acordo com a

Figura 5.8, todos os lúpulos expressaram a maior concentração de hidrocarbonetos sesquiterpênicos como a principal classe presente, conforme esperado com base na presença de cariofileno (**103**) e humuleno (**108**), com as maiores concentrações para AZAC, LORA e CASC, respectivamente. Os lúpulos ENIG e ZAPP apresentaram uma concentração considerável de hidrocarbonetos monoterpênicos, diferenciando-se dos demais; essa característica pode estar relacionada à alta concentração de β -mirceno (**22**). Além disso, o β -mirceno tem uma relação direta com a quantidade de óleo essencial produzido pelo lúpulo em relação à sua via biossintética, conferindo uma complexidade diferente ao lúpulo [17].

Figura 5.8: Composição das amostras de lúpulo AZAC, CASC, ENIG, LORA e ZAPP com base nas classes de compostos expressas em porcentagem (%)



A quantidade de dados fornecidos pelo GC×GC ilustra a facilidade em perfilar e descrever a composição da amostra, e o uso de ferramentas de estatística multivariadas auxilia na interpretação destes dados. Considerando os dados na **Tabela 5.5**, a análise de componentes principais (PCA) foi aplicada aos compostos identificados. Para a PCA, o modelo foi construído com a área de pico relativa (%) de cada composto, com a seleção de autoescalamamento como pré-processamento e 3 PCs representando 81,70% da variância, sendo 34,19% para PC1, 24,24% para PC2 e 23,27% para PC3.

Figure 3 consists of two PCA plots, (A) and (B), showing the separation of 130 samples based on their genetic background and treatment. Plot (A) shows PC1 (34,19%) on the x-axis and PC2 (24,24%) on the y-axis. Plot (B) shows PC1 (34,19%) on the x-axis and PC3 (23,27%) on the y-axis. Both plots show four distinct clusters of samples, each representing a different genetic background and treatment combination: LORA (green), AZAC (blue), CASC (red), and ENIG (orange). The samples are numbered, and some are grouped together in boxes, indicating they belong to the same cluster. The plots show that the genetic background and treatment combination are the primary factors driving the separation of the samples.

Os gráficos de biplot, **Figura 5.9**, representam (A) PC1xPC2 e (B) PC2xPC3, onde as amostras (*scores*) são representadas por triângulos vermelhos e os compostos (*loadings*) por quadrados azuis. Para melhorar a visualização dos compostos relacionados a cada amostra, regiões coloridas foram desenhadas para AZAC (azul), CASC (vermelho), ENIG (laranja), LORA (verde) e ZAPP (cinza). Em relação a esse

resultado, uma diversidade de substâncias está relacionada às amostras, e como esperado, a complexidade dos compostos formados durante o metabolismo do lúpulo.

A distribuição dos compostos pode ser observada com o lúpulo ZAPP relacionado à parte positiva do PC1, enquanto o ENIG está presente na parte negativa do PC2, o AZAC na parte positiva do PC1 e na parte negativa do PC2, embora o PC3 mostre o LORA na seção positiva e o CASC na negativa.

Caracterizando alguns dos compostos na PCA, a atenção pode ser direcionada para os compostos únicos em cada uma das amostras, com a presença de aglomerados próximos aos seus respectivos triângulos vermelhos e expressos nos retângulos. Ao caracterizar cada um dos lúpulos, o AZAC mostra a influência dos compostos hexanal (**1**), p-cimeno (**33**), os hidrocarbonetos sesquiterpênicos δ -cadineno (**124**), calameneno (**125**) e α -calacoreno (**130**), as cetonas 2-nonanona (**48**), 2-decanona (**65**), 2-undecanona (**79**), 2-dodecanona (**96**) e 2-tridecanona (**116**). Isso mostra uma conexão significativa entre o AZAC e a cetona formada em seu metabolismo. Em relação aos relatos da literatura [55], o lúpulo AZAC foi estudado por GC–MS e um método para a fração de óleo essencial hidrodestilado seguido por HS-SPME. Este estudo também mostrou uma alta concentração de cariofileno e uma alta porcentagem de humuleno, conforme relatado pelos resultados na **Tabela 5.5**.

Para o lúpulo CASC, os hidrocarbonetos monoterpênicos canfeno (**14**) e perileno (**52**) e os monoterpênicos oxigenados geraniol (**73**), óxido cis-linalol (**44**) e óxido trans-linalol (**47**) foram relacionados pela análise de PCA. Isso mostra que o CASC tem uma relação com a autooxidação do mirceno [190,223] pela formação de geraniol, um importante odor floral no óleo essencial de lúpulo, assim como a presença de canfeno e óxido de linalol em suas duas formas isoméricas, relacionadas ao "aroma europeu de lúpulo" [90,223]. O lúpulo CASC é amplamente estudado na literatura, como no estudo GC×GC-TOFMS de Yan et al. [103], e por GC–MS em outros estudos [224]. Nos resultados de Yan et al., a fração de óleo essencial de CASC foi hidrodestilada e, como resultado, também exibiu a presença de geraniol e perileno, comprovando certas semelhanças.

Ao ser comparada com a composição de humuleno (36,44%) e β -mirceno (5,93%) (observando limitações devido à amostragem por SPME), este capítulo mostra um comportamento contrário à literatura [103,224,225], onde a concentração de β -mirceno é maior do que a de humuleno, explicada como uma amostra distinta com uma provável causa de baixo teor de β -mirceno e alto teor de

humuleno relacionado ao período de maturação, mais especificamente uma colheita precoce ou um lúpulo não totalmente maduro [17,222].

Em relação ao ENIG, três classes foram significativas: os hidrocarbonetos monoterpênicos tinham a composição de β -mirceno (**22**), β -ocimeno (**35**) e trans- β -ocimeno (**36**), os dois hidrocarbonetos sesquiterpênicos (E)- β -farneseno (**107**) e β -eudesmene (**117**), e os ésteres isobutil 2-metilbutanoato (**25**) e 2-metilbutil octanoato (**106**). A existência de β -farneseno em amostras é relatada em baixas concentrações quando presente no lúpulo [17,222], e isso pode ser um diferencial do lúpulo ENIG, enquanto a presença dos monoterpenos β -mirceno com a maior concentração, e as duas formas de β -ocimeno.

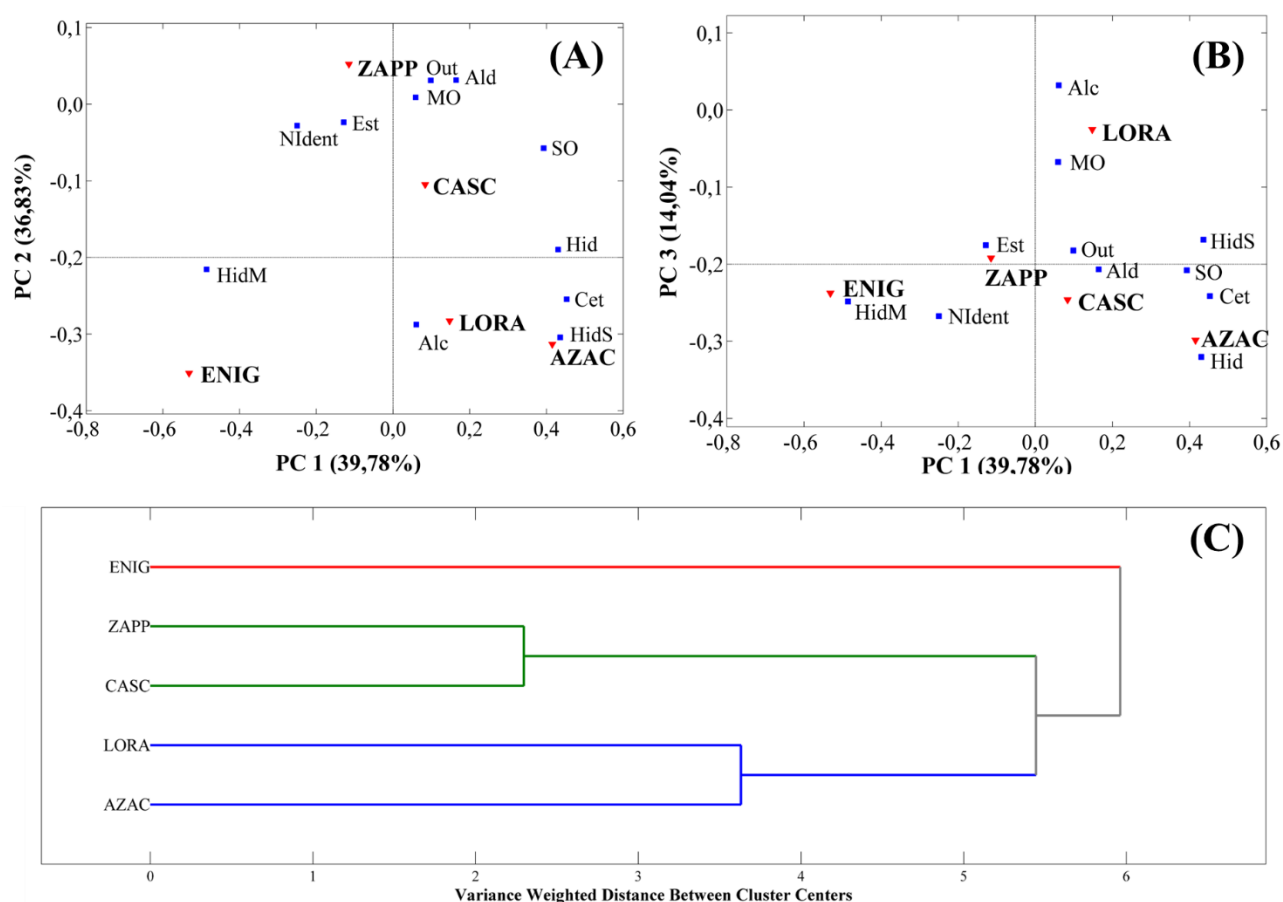
Na composição de LORA observaram-se os ésteres isoamil isobutanoato (**28**), etil heptanoato (**49**), hexil isobutirato (**63**), etil octanoato (**66**), ácido metil éster trans-grânico (**84**), ácido isobutírico 1-metiloctílico (**88**) e etil cis-4-decenoato (**92**). Como relatado, o principal grupo responsável pela separação da PCA foram os ésteres, mesmo nos compostos específicos expressos apenas pelo lúpulo LORA. No entanto, compostos como fenchol (**58**), α -terpineol (**67**), perillaldeído (**77**) e α -citral (**75**) foram importantes álcoois e aldeídos monoterpênicos para a composição química desse lúpulo.

Finalmente, o ZAPP mostrou dois compostos dentro do agrupamento de compostos específicos: isobutirato de prenil (**38**) e 6-metileptanoato de metila (**46**) e relações com os ésteres acetato de 2-metilbutila (**5**), isobutirato de isobutila (**6**), isobutirato de butila (**12**), propionato de 2-metilbutila (**16**), isobutirato de isobutila (**29**), metil 8-metilnonanoato (**78**), metil decanoato (**83**) e metil 3,6-dodecadienoato (**119**), os hidrocarbonetos monoterpênicos γ -terpineno (**42**), isoterpinoleno (**45**) e α -muuroleno (**118**). ZAPP foi semelhante à amostra LORA, onde a classe de ésteres teve a capacidade de representar a separação de amostras pela PCA.

Com base em todas as informações descritas e observando alguns padrões na PCA (**Figura 5.9**), as classes de compostos também foram estudadas de acordo com a PCA e a HCA. Para a PCA, o modelo foi desenvolvido com a soma das áreas cromatográficas relativas (%) de cada classe, usando a seleção de autoescalamento como pré-processamento e 3 PCs representando 90,58% da variância, exibindo a variância de 39,78% para PC1, 36,72% para PC2 e 14,08% para PC3. Quanto à HCA, autoescalamento foi usado como pré-processamento, o método de Ward foi aplicado como algoritmo e a PCA foi usada para escolher 3 PCs. Os gráficos de PCA estão

expressos como gráficos de *biplot*, **Figura 5.10a** (PC1xPC2) e **Figura 5.10b** (PC1xPC3), enquanto a HCA é representada pela **Figura 5.10c**.

Figura 5.10: Análise estatística multivariada de PCA expressa pelo gráfico de biplot de PC1xPC2 (A), PC1xPC3 (B) e o HCA (C) para os lúpulos AZAC, CASC, ENIG, LORA e ZAPP em relação às classes de compostos.



A PCA para as classes de compostos agrupa a amostra ZAPP pela PC2, LORA pela PC3 e ENIG pela PC1. Como explicado anteriormente, isso representa que a amostra ZAPP foi mais influenciada por ésteres, LORA por álcoois e ENIG por hidrocarbonetos monoterpênicos, com a influência de cetonas sobre o lúpulo AZAC. A HCA deu a maior similaridade entre as classes de ZAPP e CASC, seguida por LORA e AZAC, o que significa que, em comparação com os resultados mostrados pela PCA, as duas primeiras classes foram amplamente influenciadas por ésteres, aldeídos, monoterpênicos oxigenados e sesquiterpenos, enquanto as duas últimas foram mais afetadas por hidrocarbonetos monoterpênicos e cetonas.

5.4 Conclusões

A identificação de compostos como parte de um estudo global por meio desta metodologia proporciona uma cobertura considerável da expressão de metabólitos voláteis, sendo possível descrever tanto compostos majoritários quanto minoritários, incluindo aqueles possivelmente não facilmente mensurados por separações de GC unidimensional. Assim, a identificação de 137 substâncias em 5 amostras de lúpulo é descrita, com o potencial de separar 471 picos. Isso, é claro, destaca também que, em termos de identificação de metabólitos, apenas ter a capacidade de separar compostos individuais não é o mesmo que poder identificá-los de forma inequívoca. Nesse sentido, em comparação com a técnica convencional de GC–MS, o GC×GC–MS melhora a separação por meio de um aumento de mais de até 316,8% no número de picos reconhecidos como componentes distintos. Este estudo relata um estudo global no lúpulo, por meio da atribuição detalhada de classes químicas de compostos que podem ser amplamente separados no espaço 2D da análise de GC×GC. A análise estatística multivariada comprovou uma semelhança entre as amostras ZAPP e CASC, e as amostras AZAC e LORA. O HS-SPME-GC×GC–MS se mostra promissor para análises de metabólitos presentes no lúpulo.

Capítulo 6. Conclusões gerais

Este capítulo tem propósito sumarizar as conclusões finais desta tese. Como foi discutido no Capítulo 2 por uma revisão bibliográfica sistêmica do assunto, a empregabilidade de técnicas analíticas assim como o estudo de cerveja é de alta importância para o desenvolvimento econômico, científico e social. Uma vez que o uso de micronutrientes pode trazer benefícios para a saúde humana, é essencial entender-se o comportamento deles em amostras.

Desta forma, foi descoberto no capítulo 3 que a presença de micronutrientes de Cr, Se e Mo, conforme as legislações vigentes, pode alterar a composição físico-química de cervejas durante o processo de fermentação. Dentre as 12 análises físico-químicas aplicadas, verificaram-se comportamentos como o aumento da produção de etanol em amostras suplementadas com todos os nutrientes assim como outras alterações. A partir de ferramentas de estatística multivariada foi possível descrever como os nutrientes alteraram as propriedades da bebida. Como exemplo, pode-se ressaltar a cor e níveis de VDK sendo alteradas a partir da presença de micronutriente de cromo. E com as perspectivas deste capítulo apresentando a capacidade de mudanças novos estudos podem ser aplicados.

Dentre as possibilidades de estudo, surgiu o questionamento sobre a alteração do perfil de voláteis em cervejas com presença de micronutrientes durante a fermentação. No capítulo 4 foi aplicado o uso de técnica analítica moderna de GC×GC em cervejas com o preparo de amostras por HS-SPME e detector quadrupolo simples MS. Neste contexto, a inserção de micronutrientes comerciais de Se e Cr nas mesmas proporções aplicadas no capítulo anterior foi empregada em 4 tipos diferentes de cerveja. Devido ao grande número de dados gerados o uso de MPCA foi essencial para descrever as diferenças entre amostras. Assim, notou-se que muitos compostos poderiam ser identificados (220 compostos), incluindo as matérias primas lúpulo e

mosto. Além disso, pela MPCA foi possível verificar diferenças a partir da tendência de agrupamento, principalmente pelo micronutriente Cr, incluindo alteração em etanol e outros álcoois superiores.

Dada a capacidade de detecção de voláteis em HS-SPME-GC×GC-MS para lúpulos, o capítulo 5 reporta o primeiro estudo do uso dessa metodologia em lúpulo. Para o desenvolvimento do método, ocorreu a otimização da configuração do GC×GC, comparação com a 1DGC, escolha da fibra de SPME, massa de lúpulo e condições de extração utilizando de planejamento de experimentos do tipo BBD. Aplicando este método para diferentes tipos de lúpulo, foi determinado o perfil químico dos mesmos com a identificação tentativa de 137 compostos. Além da análise pelos compostos, também ocorreu a análise pelas classes presentes na matriz. Concluindo-se que essa é uma metodologia que é de interesse para análise de metabólitos em lúpulos de modo geral.

Muitas são as perspectivas geradas por este trabalho que já estão sendo estudadas pelos autores, tais como um maior entendimento do comportamento dos micronutrientes pelo perfil cinético, análise de um maior número de amostras de lúpulo por GC×GC, aplicação de novos métodos para determinação de açúcares e análise pelas métricas de química verde, dentre outras possibilidades.

Finalmente, o uso de ferramentas quimiométricas, juntamente com as técnicas analíticas adequadas, permitiram a avaliação e aquisição de dados confiáveis que colaboram com o avanço da ciência e tecnologia cervejeira.

Referências

1. MAPA. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Instrução normativa no. 65, de 10 de dezembro de 2019*; Brasília, DF, Volume Seção 1, p.31.
2. Bamforth, C.W. Beer: an ancient yet modern biotechnology. *The Chemical Educator* **2000**, 5, 102-112, doi:10.1007/s00897000378a.
3. MAPA. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Decreto no. 6871, de 04 de junho de 2009*; Brasília, DF, Volume Seção 1.
4. Bamforth, C.W. *Brewing: new technologies*; Woodhead Publishing Series Cambridge, 2006.
5. Steensels, J.; Snoek, T.; Meersman, E.; Picca Nicolino, M.; Voordeckers, K.; Verstrepen, K.J. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiology Reviews* **2014**, 38, 947-995, doi:10.1111/1574-6976.12073.
6. Hunt, R.W.; Zavalin, A.; Bhatnagar, A.; Chinnasamy, S.; Das, K.C. Electromagnetic biostimulation of living cultures for biotechnology, biofuel and bioenergy applications. *International Journal of Molecular Sciences* **2009**, 10, 4515-4558, doi:10.3390/ijms10104515.
7. Kirin. Kirin beer university report global beer production by country in 2018. Available online: https://www.kirinholdings.com/en/newsroom/release/2019/1003_01.html (accessed on 12 mar. 2021).
8. Kirin. Global beer consumption by country in 2019. Available online: https://www.kirinholdings.com/en/newsroom/release/2020/1229_01.pdf (accessed on 12 mar. 2021).
9. Michaelis. Dicionário brasileiro da língua portuguesa. **2021**.
10. Mallet, J. *Malt: a practical guide from field to brewhouse*; Brewers publications: Boulder, 2014.
11. Venturini Filho, W.G.; Cereda, M.P. Cerveja. In *Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos*; Blucher: São Paulo, 2001; Volume 4, pp. 91-144.
12. Kunze, W.; Hendel, O. *Technology malting and brewing*, 3rd ed.; VLB Berlin: Berlin, 2004; p. 948.
13. Carvalho, D.O.; Gonçalves, L.M.; Guido, L.F. Overall antioxidant properties of malt and how they are influenced by the individual constituents of barley and the malting process. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **2016**, 15, 927-943, doi:10.1111/1541-4337.12218.
14. Hieronymus, S. *For the love of hops: a practical guide to aroma, bitterness, and the culture of hops*; Beers publications: Boulder, 2012.
15. Dragone, G.; Oliveira e Silva, T.A.; Almeida e Silva, J.B. Cerveja. In *Bebidas Alcoólicas: ciência e tecnologia*, 2nd ed.; Blucher: São Paulo, 2016; pp. 51-84.
16. Durello, R.; Silva, L.; Bogusz Jr, S. Química do lúpulo. *Química Nova* **2019**, 42, 900-919, doi:10.21577/0100-4042.20170412.
17. 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**, 120, 289-314, doi:10.1002/jib.160.

18. Rettberg, N.; Biendl, M.; Garbe, L.-A. Hop aroma and hoppy beer flavor: chemical backgrounds and analytical tools—a review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2018**, *76*, 1-20, doi:10.1080/03610470.2017.1402574.
19. Palmer, J.; Kaminski, C. *Water – A comprehensive guide for brewers*; Brewers publication: Boulder, 2013; p. 300.
20. Taylor, D.G. Water. In *Handbook of Brewing*, 3rd ed.; Stewart, G.G., Russell, I., Anstruther, A., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2017; pp. 67-106.
21. Eumann, M.; Schildbach, S. 125th anniversary review: Water sources and treatment in brewing. *Journal of the Institute of Brewing* **2012**, *118*, 12-21, doi:10.1002/jib.18.
22. Nelson, D.L.; Cox, M.M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*; Artmed: São Paulo, 2014; p. 1336.
23. Menezes e Silva, C.H.P. *Microbiologia da cerveja*; Livraria da Física: São Paulo, 2019; p. 369.
24. Sigler, K.; Matoulková, D. Stress responses in brewing yeast. *Kvasny Prumysl* **2011**, *57*, 277-284, doi:10.18832/kp2011032.
25. White, C.; Zainasheff, J. *Yeast: the practical guide to beer fermentation*; Brewers publications: Boulder, 2010; p. 300.
26. Boulton, C.; Quain, D. *Brewing Yeast and Fermentation*; Blackwell Science: 2001; p. 656.
27. Walther, A.; Hesselbart, A.; Wendland, J. Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **2014**, *4*, 783-793, doi:10.1534/g3.113.010090.
28. Libkind, D.; Hittinger, C.T.; Valerio, E.; Goncalves, C.; Dover, J.; Johnston, M.; Goncalves, P.; Sampaio, J.P. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2011**, *108*, 14539-14544, doi:10.1073/pnas.1105430108.
29. Costa, L.M.R. Produção de cerveja artesanal pela fermentação de uma levedura da jabuticaba: análise da cinética local de metabólitos voláteis e dos efeitos das variáveis no processo. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.
30. Léon, M.P. Seleção de leveduras não *Saccharomyces* para produção de cervejas especiais. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020.
31. da Silva, J.M.; Ribeiro, K.C.; Teles, G.H.; Ribeiro, E.; de Moraes Junior, M.A.; de Barros Pita, W. Fermentation profiles of the yeast *Brettanomyces bruxellensis* in d-xylose and l-arabinose aiming its application as a second-generation ethanol producer. *Yeast* **2020**, *37*, 597-608, doi:10.1002/yea.3519.
32. ANVISA. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Resolução RDC no. 64, de 29 de novembro de 2011*; Brasília, DF.
33. ANVISA. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Resolução RDC no. 65, de 29 de novembro de 2011*; Brasília, DF.
34. Dzialo, M.C.; Park, R.; Steensels, J.; Lievens, B.; Verstrepen, K.J. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews* **2017**, *41*, S95-S128, doi:10.1093/femsre/flux031.
35. Briggs, D.E.; Brookes, P.A.; Stevens, R.; Boulton, C.A. *Brewing: Science and practice*; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, 2004.
36. Vermeersch, L.; Perez-Samper, G.; Cerulus, B.; Jariani, A.; Gallone, B.; Voordeckers, K.; Steensels, J.; Verstrepen, K.J. On the duration of the microbial lag phase. *Current Genetics* **2019**, *65*, 721-727, doi:10.1007/s00294-019-00938-2.
37. Diaz-Ruiz, R.; Rigoulet, M.; Devin, A. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **2011**, *1807*, 568-576, doi:10.1016/j.bbabi.2010.08.010.
38. Pires, J.M.C. Efeito Crabtree em *Saccharomyces cerevisiae* e sua modulação por nanopartículas de dióxido de titânio. Universidade de Évora, Évora, 2017.
39. Arroyo-López, F.N.; Orlić, S.; Querol, A.; Barrio, E. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, S.

- kudriavzevii* and their interspecific hybrid. *International Journal of Food Microbiology* **2009**, 131, 120-127, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.035.
40. Stewart, G. The production of secondary metabolites with flavour potential during brewing and distilling wort fermentations. *Fermentation* **2017**, 3, 63, doi:10.3390/fermentation3040063.
41. Lei, H.; Zhao, H.; Yu, Z.; Zhao, M. Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2012**, 166, 1562-1574, doi:10.1007/s12010-012-9560-8.
42. Li, H.; Liu, F. Changes in organic acids during beer fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2015**, 73, 275-279, doi:10.1094/asbcj-2015-0509-01.
43. Olaniran, A.O.; Hiralal, L.; Mokoena, M.P.; Pillay, B. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing* **2017**, 123, 13-23, doi:10.1002/jib.389.
44. Dickinson, J.R.; Schweizer, M. *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*, 2nd ed.; CRC Press: Boca Raton, 2004; p. 480.
45. Serafim, F.A.T.; Seixas, F.R.F.; Silva, A.A.D.; Galinaro, C.A.; Nascimento, E.S.P.; Buchviser, S.F.; Odello, L.; Franco, D.W. Correlation between chemical composition and sensory properties of brazilian sugarcane spirits (cachaças). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2013**, 24, 973-982, doi:10.5935/0103-5053.20130125.
46. ASBC. ASBC Method of Analysis. Available online: <https://www.asbcnet.org/Methods/pages/default.aspx> (accessed on 11 mar. 2021).
47. Cutaia, A.J.; Reid, A.-J.; Speers, R.A. Examination of the relationships between original, real and apparent extracts, and alcohol in pilot plant and commercially produced beers. *Journal of the Institute of Brewing* **2009**, 115, 318-327, doi:10.1002/j.2050-0416.2009.tb00387.x.
48. Piggott, J. *Alcoholic beverages: Sensory evaluation and consumer research*; Woodhead Publishing Limited: Cambridge, 2012; p. 502.
49. Fulgencio, A.C.C.; Resende, G.A.P.; Teixeira, M.C.F.; Botelho, B.G.; Sena, M.M. Screening method for the rapid detection of diethylene glycol in beer based on chemometrics and portable near-infrared spectroscopy. *Food Chemistry* **2022**, 391, 133258, doi:10.1016/j.foodchem.2022.133258.
50. Skoog, D.A.; West, D.M.; Holler, F.J.; Crouch, S.R. Cromatografia de gás. In *Fundamentos de química analítica*, 9 ed. ed.; Cengage learning: São Paulo, 2014; pp. 879-904.
51. Harris, D.C. Cromatografia a gás. In *Análise química quantitativa*, 9 ed. ed.; LTC: Rio de Janeiro, 2017; pp. 621-651.
52. Collins, C.H.; Braga, G.L.B.; Pierina S. *Fundamentos de cromatografia*; Editora Unicamp: Campinas, 2006; p. 453.
53. Van den dool, H.; Kratz, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography A* **1963**, 11, 463-471, doi:10.1016/s0021-9673(01)80947-x.
54. James, A.T.; Martin, A.J.P. Gas-liquid partition chromatography. A technique for the analysis of volatile materials. *The Analyst* **1952**, 77, 915-932, doi:10.1039/an9527700915.
55. Golay, M.J. Theory of chromatography in open and coated tubular columns with round and rectangular cross-sections. *Gas chromatography* **1958**, 2, 36-55.
56. McLafferty, F.W.; Gohike, R.S. Mass spectrometric Analysis. Spectral data file utilizing machine filing and manual searching. *Analytical Chemistry* **1959**, 31, 1160-1163, doi:10.1021/ac60151a025.
57. Eckenrode, B.A. The application of an integrated multifunctional field-portable GC/MS system. *Field Analytical Chemistry & Technology* **1998**, 2, 3-20, doi:10.1002/(sici)1520-6521(1998)2:1<3::Aid-fact2>3.0.Co;2-z.

-
58. Liu, Z.; Phillips, J.B. Comprehensive two-dimensional gas chromatography using an on-column thermal modulator interface. *Journal of Chromatographic Science* **1991**, *29*, 227-231, doi:10.1093/chromsci/29.6.227.
 59. von Mühlen, C.; Zini, C.A.; Caramão, E.B. Nomenclatura na língua portuguesa em cromatografia multidimensional abrangente. *Química Nova* **2007**, *30*, 682-687, doi:10.1590/s0100-40422007000300030.
 60. Wu, Z.-y.; Schoemakers, P.; Marriott, P. Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography—an update. *LCGC Europe* **2012**, *25*, 266–275-266–275.
 61. Nolvachai, Y.; Amaral, M.S.S.; Marriott, P.J. Foods and contaminants analysis using multidimensional gas chromatography: an update of recent studies, technology, and applications. *Analytical Chemistry* **2023**, *95*, 238-263, doi:10.1021/acs.analchem.2c04680.
 62. Amaral, M.S.S.; Nolvachai, Y.; Marriott, P.J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography advances in technology and applications: biennial update. *Analytical Chemistry* **2020**, *92*, 85-104, doi:10.1021/acs.analchem.9b05412.
 63. Gorecki, T.; Harynuk, J.; Panic, O. The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC). *Journal of Separation Science* **2004**, *27*, 359-379, doi:10.1002/jssc.200301650.
 64. Pedroso, M.P.; Godoy, L.A.F.d.; Fidélis, C.H.d.V.; Ferreira, E.C.; Poppi, R.J.; Augusto, F. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC x GC). *Química Nova* **2009**, *32*, 422-430, doi:10.1590/s0100-40422009000200029.
 65. Arthur, C.L.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* **2002**, *62*, 2145-2148, doi:10.1021/ac00218a019.
 66. Jalili, V.; Barkhordari, A.; Ghiasvand, A. A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews. *Microchemical Journal* **2020**, *152*, doi:10.1016/j.microc.2019.104319.
 67. Pawliszyn, J. Solid-Phase microextraction in perspective. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*; 2012; pp. 1-12.
 68. Pena-Pereira, F.; Wojnowski, W.; Tobiszewski, M. AGREE-Analytical GREENness metric approach and software. *Analytical Chemistry* **2020**, *92*, 10076-10082, doi:10.1021/acs.analchem.0c01887.
 69. Wojnowski, W.; Tobiszewski, M.; Pena-Pereira, F.; Psillakis, E. AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2022**, *149*, doi:10.1016/j.trac.2022.116553.
 70. Orazbayeva, D.; Koziel, J.A.; Trujillo-Rodríguez, M.J.; Anderson, J.L.; Kenessov, B. Polymeric ionic liquid sorbent coatings in headspace solid-phase microextraction: A green sample preparation technique for the determination of pesticides in soil. *Microchemical Journal* **2020**, *157*, doi:10.1016/j.microc.2020.104996.
 71. Shirey, R.E. SPME commercial devices and fibre coatings. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*; 2012; pp. 99-133.
 72. Rosendo, L.M.; Brinca, A.T.; Pires, B.; Catarro, G.; Rosado, T.; Guiné, R.P.F.; Araújo, A.R.T.S.; Anjos, O.; Gallardo, E. Miniaturized solid phase extraction techniques applied to natural products. *Processes* **2023**, *11*, doi:10.3390/pr11010243.
 73. Schmidt, K.; Podmore, I. Solid phase microextraction (SPME) method development in analysis of volatile organic compounds (VOCS) as potential biomarkers of cancer. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis* **2015**, *06*, 1000253, doi:10.4172/2155-9929.1000253.
 74. Pawliszyn, J. Theory of solid-phase microextraction. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*; 2012; pp. 13-59.
 75. Kudlejova, L.; Risticvic, S.; Vuckovic, D. Solid-Phase microextraction method development. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*; 2012; pp. 201-249.
 76. Martins, C.; Brandão, T.; Almeida, A.; Rocha, S.M. Insights on beer volatile profile: Optimization of solid-phase microextraction procedure taking advantage of the

- comprehensive two-dimensional gas chromatography structured separation. *Journal of Separation Science* **2015**, 38, 2140-2148, doi:10.1002/jssc.201401388.
77. Fazzalari, F.A. *Compilation of odor and taste threshold values data*; 1978.
78. Miller, G.H. Threshold data. In *Whisky Science*; Springer Nature: Davis, CA, 2019; pp. 421-468.
79. Caudy, A.A.; Mulleder, M.; Ralser, M. Metabolomics in yeast. *Cold Spring Harbor Protocols* **2017**, 2017, 677-680, doi:10.1101/pdb.top083576.
80. Cavallini, N.; Savorani, F.; Bro, R.; Cocchi, M. A metabolomic approach to beer characterization. *Molecules* **2021**, 26, doi:10.3390/molecules26051472.
81. Seeley, J.V.; Seeley, S.K. Multidimensional gas chromatography: fundamental advances and new applications. *Analytical Chemistry* **2013**, 85, 557-578, doi:10.1021/ac303195u.
82. Li, g.; Liu, F.; Kun-Farkas, G.; Kiss, Z. Quantitative analysis of flavor volatiles in beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detection (HS-SPME-GC-FID). *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2018**, 73, 261-265, doi:10.1094/asbcj-2015-0618-01.
83. Alvim, R.P.R.; de Cássia Oliveira Gomes, F.; Garcia, C.F.; de Lourdes Almeida Vieira, M.; de Resende Machado, A.M. Identification of volatile organic compounds extracted by headspace solid-phase microextraction in specialty beers produced in Brazil. *Journal of the Institute of Brewing* **2017**, 123, 219-225, doi:10.1002/jib.416.
84. Alves, V.; Goncalves, J.; Figueira, J.A.; Ornelas, L.P.; Branco, R.N.; Camara, J.S.; Pereira, J.A.M. Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. *Food Chemistry* **2020**, 326, 126856, doi:10.1016/j.foodchem.2020.126856.
85. Ocvirk, M.; Mlinarič, N.K.; Košir, I.J. Comparison of sensory and chemical evaluation of lager beer aroma by gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2018**, 98, 3627-3635, doi:10.1002/jsfa.8840.
86. Pinu, F.R.; Villas-Boas, S.G. Rapid quantification of major volatile metabolites in fermented food and beverages using gas chromatography-mass spectrometry. *Metabolites* **2017**, 7, 37, doi:10.3390/metabo7030037.
87. Zhang, P.; Carlin, S.; Lotti, C.; Mattivi, F.; Vrhovsek, U. On sample preparation methods for fermented beverage VOCs profiling by GCxGC-TOFMS. *Metabolomics* **2020**, 16, 102, doi:10.1007/s11306-020-01718-7.
88. Stefanuto, P.H.; Perrault, K.A.; Dubois, L.M.; L'Homme, B.; Allen, C.; Loughnane, C.; Ochiai, N.; Focant, J.F. Advanced method optimization for volatile aroma profiling of beer using two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2017**, 1507, 45-52, doi:10.1016/j.chroma.2017.05.064.
89. Sun, S.; Wang, X.; Yuan, A.; Liu, J.; Li, Z.; Xie, D.; Zhang, H.; Luo, W.; Xu, H.; Liu, J.; et al. Chemical constituents and bioactivities of hops (*Humulus lupulus* L.) and their effects on beer-related microorganisms. *Food and Energy Security* **2022**, 11, e367, doi:10.1002/fes3.367.
90. Eyres, G.; Dufour, J.-P. Hop essential oil: analysis, chemical composition and odor characteristics. In *Beer in health and disease prevention* Academic Press: 2009; pp. 239-254.
91. Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; Liberto, E.; Cordero, C.; Bicchi, C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. *Flavour and Fragrance Journal* **2010**, 25, 282-290, doi:10.1002/ffj.1984.
92. Richter, T.M.; Eyres, G.T.; Silcock, P.; Bremer, P.J. Comparison of four extraction methods for analysis of volatile hop-derived aroma compounds in beer. *Journal of Separation Science* **2017**, 40, 4366-4376, doi:10.1002/jssc.201700676.
93. Aberl, A.; Coelhan, M. Determination of volatile compounds in different hop varieties by headspace-trap GC/MS--in comparison with conventional hop essential oil analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, 60, 2785-2792, doi:10.1021/jf205002p.

-
94. Jorge, K.; Trugo, L.C. Discrimination of different hop varieties using headspace gas chromatographic data. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2003**, *14*, 411-415, doi:10.1590/s0103-50532003000300012.
 95. Eri, S.; Khoo, B.K.; Lech, J.; Hartman, T.G. Direct thermal desorption-gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry profiling of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oils in support of varietal characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 1140-1149, doi:10.1021/jf9911850.
 96. Abolghasemi, M.M.; Piryaee, M. Development of direct microwave desorption/gas chromatography mass spectrometry system for rapid analysis of volatile components in medicinal plants. *Journal of Separation Science* **2020**, *43*, 782-787, doi:10.1002/jssc.201900821.
 97. Priest, M.A.; Boersma, J.A.; Bronczyk, S.A. Effects of aging on hops and liquid CO₂ hop extracts. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2018**, *49*, 98-100, doi:10.1094/asbcj-49-0098.
 98. Kishimoto, T.; Teramoto, S.; Fujita, A.; Yamada, O. Principal component analysis of hop-derived odorants identified by stir bar sorptive extraction method. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2020**, *79*, 272-280, doi:10.1080/03610470.2020.1843926.
 99. Kovačević, M.; Kač, M. Solid-phase microextraction of hop volatiles. Potential use for determination and verification of hop varieties. *Journal of Chromatography A* **2001**, *918*, 159-167, doi:10.1016/s0021-9673(01)00719-1.
 100. Gonçalves, J.L.; Figueira, J.A.; Rodrigues, F.P.; Ornelas, L.P.; Branco, R.N.; Silva, C.L.; Camara, J.S. A powerful methodological approach combining headspace solid phase microextraction, mass spectrometry and multivariate analysis for profiling the volatile metabolomic pattern of beer starting raw materials. *Food Chemistry* **2014**, *160*, 266-280, doi:10.1016/j.foodchem.2014.03.065.
 101. Dufour, J.-P.; Marriott, P.J.; Reboul, E.; Leus, M.; Silcock, P. Quantitative analysis of complex flavour mixtures using comprehensive multidimensional gas chromatography. In Proceedings of the Flavour Research at the Dawn of the 21st Century, Beaune, France, 24-28 June, 2002.
 102. Yan, D.; Tedone, L.; Koutoulis, A.; Whittock, S.P.; Shellie, R.A. Parallel comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2017**, *1524*, 202-209, doi:10.1016/j.chroma.2017.09.063.
 103. Yan, D.; Wong, Y.F.; Tedone, L.; Shellie, R.A.; Marriott, P.J.; Whittock, S.P.; Koutoulis, A. Chemotyping of new hop (*Humulus lupulus* L.) genotypes using comprehensive two-dimensional gas chromatography with quadrupole accurate mass time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2018**, *1536*, 110-121, doi:10.1016/j.chroma.2017.08.020.
 104. Reglitz, K.; Steinhaus, M. Quantitation of 4-Methyl-4-sulfanylpentan-2-one (4MSP) in hops by a stable isotope dilution assay in combination with GCxGC-TOFMS: method development and application to study the influence of variety, Provenance, harvest year, and processing on 4MSP concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65*, 2364-2372, doi:10.1021/acs.jafc.7b00455.
 105. Schmidt, C.; Biendl, M.; Hanke, S.; Reglitz, K.; Steinhaus, M. Dry hopping potential of Eureka!, a new hop variety. *Brewing Science* **2019**, *72*, 173-178.
 106. Reglitz, K.; Lemke, N.; Steinhaus, M.; Hanke, S. On the behavior of the important hop odorant 4-mercapto-4-methylpentan-2-one (4MMP) during dry hopping and during Storage of dry hopped beer *Brewing Science* **2018**, *71*, 96-99, doi:10.23763/BrSc18-13steinhaus
 107. Yan, D.; Wong, Y.F.; Whittock, S.P.; Koutoulis, A.; Shellie, R.A.; Marriott, P.J. Sequential hybrid three-dimensional gas chromatography with accurate mass spectrometry: a novel tool for high-resolution characterization of multicomponent samples. *Analytical Chemistry* **2018**, *90*, 5264-5271, doi:10.1021/acs.analchem.8b00142.

108. Inui, T.; Matsui, H.; Hosoya, T.; Kumazawa, S.; Fukui, N.; Oka, K. Effect of harvest time and pruning date on aroma characteristics of hop teas and related compounds of Saaz hops. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2016**, *74*, 231-241, doi:10.1094/asbcj-2016-4628-01.
109. Inui, T.; Tsuchiya, F.; Ishimaru, M.; Oka, K.; Komura, H. Different beers with different hops. Relevant compounds for their aroma characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 4758-4764, doi:10.1021/jf3053737.
110. Lusk, L.T.; Kay, S.B.; Porubcan, A.; Ryder, D.S. Key olfactory cues for beer oxidation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2012**, *70*, 257-261, doi:10.1094/asbcj-2012-0907-01.
111. Eyres, G.; Marriott, P.J.; Dufour, J.-P. The combination of gas chromatography-olfactometry and multidimensional gas chromatography for the characterisation of essential oils. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1150*, 70-77, doi:10.1016/j.chroma.2006.07.019.
112. Eyres, G.T.; Marriott, P.J.; Dufour, J.-P. Comparison of odor-active compounds in the spicy fraction of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oil from four different varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 6252-6261, doi:10.1021/jf070739t.
113. Roberts, M.T.; Dufour, J.P.; Lewis, A.C. Application of comprehensive multidimensional gas chromatography combined with time-of-flight mass spectrometry (GC x GC-TOFMS) for high resolution analysis of hop essential oil. *Journal of Separation Science* **2004**, *27*, 473-478, doi:10.1002/jssc.200301669.
114. Berner, T.S.; Arneborg, N. The role of lager beer yeast in oxidative stability of model beer. *Letters in Applied Microbiology* **2012**, *54*, 225-232, doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03195.x.
115. Kucharczyk, K.; Tuszyński, T. The effect of pitching rate on fermentation, maturation and flavour compounds of beer produced on an industrial scale. *Journal of the Institute of Brewing* **2015**, *121*, 349-355, doi:10.1002/jib.242.
116. Younis, O.S.; Stewart, G.G. Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing* **1998**, *104*, 255-264, doi:10.1002/j.2050-0416.1998.tb00998.x.
117. Klug, L.; Daum, G. Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Research* **2014**, *14*, 369-388, doi:10.1111/1567-1364.12141.
118. Pohl, P. Determination and fractionation of metals in beer: A review. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2008**, *25*, 693-703, doi:10.1080/02652030701772323.
119. Pohl, P. Metals in beer. In *Beer in Health and Disease Prevention*, Elsevier, Ed.; Burlington, MA, 2009; pp. 349-358.
120. Walker, G.M. Metals in yeast fermentation processes. *Advances in Applied Microbiology* **2004**, *54*, 197-229, doi:10.1016/S0065-2164(04)54008-X.
121. Walker, G.M.; de Nicola, R.; Anthony, S.; Learmonth, R.P. Yeast-metal interactions: impact on brewing and distilling fermentations. In *Proceedings of the Institute of Brewing & Distilling Asia Pacific Section 2006 Convention*; Leishman Associates: 2006.
122. Sohrabvandi, S.; Mortazavian, A.M.; Rezaei, K. Health-Related aspects of beer: A review. *International Journal of Food Properties* **2012**, *15*, 350-373, doi:10.1080/10942912.2010.487627.
123. ANVISA. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Instrução normativa no. 28, de 26 de julho de 2018*; Brasília, DF, Volume Seção 1, p. 141.
124. ANVISA. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Portaria no 31, de 13 de janeiro de 1998*; Brasília, DF, Volume Seção 1-E, p.4.
125. ANVISA. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil: Resolução RDC no. 269, de 22 de setembro de 2005. DOU no 184*.
126. Adadi, P.; Barakova, N.V.; Muravyov, K.Y.; Krivoschapkina, E.F. Designing selenium functional foods and beverages: A review. *Food Res. Int.* **2019**, *120*, 708-725, doi:10.1016/j.foodres.2018.11.029.

127. Demirci, A.; Pometto, A.L., 3rd. Production of organically bound selenium yeast by continuous fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 2491-2495, doi:10.1021/jf981198y.
128. dos Santos, M.; da Silva Júnior, F.M.R.; Muccillo-Baisch, A.L. Selenium content of Brazilian foods: A review of the literature values. *Journal of Food Composition and Analysis* **2017**, *58*, 10-15, doi:10.1016/j.jfca.2017.01.001.
129. Figueirêdo, A.F.R. Seleção de leveduras e produção de cerveja artesanal suplementada com selênio. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA, 2017.
130. Robberecht, H.; Schoor, O.; Deelstra, H. Selenium and chromium content of european beers as determined by AAS. *Journal of Food Science* **1984**, *49*, 300-301, doi:10.1111/j.1365-2621.1984.tb13736.x.
131. Souza, S.O.; Ávila, D.V.L.; Cerdà, V.; Araujo, R.G.O. Selenium inorganic speciation in beers using MSFIA-HG-AFS system after multivariate optimization. *Food Chemistry* **2022**, *367*, 130673, doi:10.1016/j.foodchem.2021.130673.
132. Rodrigo, S.; Santamaria, O.; Chen, Y.; McGrath, S.P.; Poblaciones, M.J. Selenium speciation in malt, wort, and beer made from selenium-biofortified two-rowed barley grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 5948-5953, doi:10.1021/jf500793t.
133. Ogra, Y.; Shimizu, M.; Takahashi, K.; Anan, Y. Biotransformation of organic selenium compounds in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Metallomics* **2018**, *10*, 1257-1263.
134. Rodrigo, S.; Young, S.D.; Cook, D.; Wilkinson, S.; Clegg, S.; Bailey, E.H.; Mathers, A.W.; Broadley, M.R. Selenium in commercial beer and losses in the brewing process from wheat to beer. *Food Chemistry* **2015**, *182*, 9-13, doi:10.1016/j.foodchem.2015.02.121.
135. Ponce de León, C.A.; Bayón, M.M.; Paquin, C.; Caruso, J.A. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. *Journal of Applied Microbiology* **2002**, *92*, 602-610, doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01562.x.
136. Barceloux, D.G. Molybdenum. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* **1999**, *37*, 231-237, doi:10.1081/clt-100102422.
137. Novotny, J.A.; Peterson, C.A. Molybdenum. *Advances in Nutrition* **2018**, *9*, 272-273, doi:10.1093/advances/nmx001.
138. Ross, A.C.; Caballero, B.; Cousins, R.J.; Tucker, K.L. *Modern nutrition in health and disease*, 11th ed.; Jones & Bartlett Learning: 2014; p. 1616.
139. Mendel, R.R. The molybdenum cofactor. *Journal of Biological Chemistry* **2013**, *288*, 13165-13172, doi:10.1074/jbc.R113.455311.
140. Pingale, V.S.; Kale, S.P.; Sonali, B.; Deopurkar, R.L.; Rale, V.B. Distribution of molybdenum in yeasts grown in the presence of sodium molybdate. *Letters in Applied Microbiology* **1993**, *16*, 101-103, doi:10.1111/j.1472-765X.1993.tb00355.x.
141. Crans, D.C.; Smee, J.J.; Gaidamauskiene, E.G.; Anderson, O.P.; Miller, S.M.; Jin, W.; Gaidamauskas, E.; Crubellier, E.; Grainda, R.; Chi, L.H.; et al. Inhibition of yeast growth by molybdenum-hydroxylamido complexes correlates with their presence in media at differing pH values. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2004**, *98*, 1837-1850, doi:10.1016/j.jinorgbio.2004.08.010.
142. Nishitani, T.; Shimada, M.; Kuroda, K.; Ueda, M. Molecular design of yeast cell surface for adsorption and recovery of molybdenum, one of rare metals. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, *86*, 641-648, doi:10.1007/s00253-009-2304-1.
143. Yakasai, H.M.; Rahman, M.F.; Manogaran, M.; Yasid, N.A.; Syed, M.A.; Shamaan, N.A.; Shukor, M.Y. Microbiological reduction of molybdenum to molybdenum blue as a sustainable remediation tool for molybdenum: A comprehensive review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2021**, *18*, 5731, doi:10.3390/ijerph18115731.

-
144. Gaillardet, J.; Viers, J.; Dupré, B. Trace elements in river waters. In *Treatise on Geochemistry*; 2003; pp. 225-272.
 145. Reimann, N.; Caritat, P. *Chemical elements in the environment: factsheets for the geochemist and environmental scientist*; Springer Science & Business Media: Berlin, 1998; p. 398.
 146. Glass, J.B.; Chappaz, A.; Eustis, B.; Heyvaert, A.C.; Waetjen, D.P.; Hartnett, H.E.; Anbar, A.D. Molybdenum geochemistry in a seasonally dysoxic Mo-limited lacustrine ecosystem. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **2013**, *114*, 204-219, doi:10.1016/j.gca.2013.03.023.
 147. Askew, H.O.; Monk, R.J.; Watson, J. Molybdenum deficiency of the hop. *New Zealand Journal of Agricultural Research* **1958**, *1*, 553-568, doi:10.1080/00288233.1958.10431541.
 148. Gupta, U.C. Boron and molybdenum nutrition of wheat, barley and oats grown in prince edward island soils. *Canadian Journal of Soil Science* **1971**, *51*, 415-422, doi:10.4141/cjss71-056.
 149. Bengough, W.I.; Harris, G. General composition of non-biological hazes of beers and some factors in their formation. Part I. *Journal of the Institute of Brewing* **1955**, *61*, 134-145, doi:10.1002/j.2050-0416.1955.tb06254.x.
 150. Mastanjević, K.; Krstanović, V.; Lukinac, J.; Jukić, M.; Vulin, Z.; Mastanjević, K. Beer – The importance of colloidal stability (non-biological haze). *Fermentation* **2018**, *4*, 91, doi:10.3390/fermentation4040091.
 151. Chen, S.; Jin, X.; Shan, Z.; Li, S.; Yin, J.; Sun, T.; Luo, C.; Yang, W.; Yao, P.; Yu, K.; et al. Inverse association of plasma chromium levels with newly diagnosed type 2 diabetes: A case-control study. *Nutrients* **2017**, *9*, doi:10.3390/nu9030294.
 152. Séby, F.; Vacchina, V. Critical assessment of hexavalent chromium species from different solid environmental, industrial and food matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *104*, 54-68, doi:10.1016/j.trac.2017.11.019.
 153. Swaroop, A.; Bagchi, M.; Preuss, H.G.; Zafra-Stone, S.; Ahmad, T.; Bagchi, D. Benefits of chromium(III) complexes in animal and human health. In *The Nutritional Biochemistry of Chromium (III)*, 2nd ed.; Vicent, J.B., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2019; pp. 251-278.
 154. Vincent, J.B. The biochemistry of chromium. *The Journal of Nutrition* **2000**, *130*, 715-718, doi:10.1093/jn/130.4.715.
 155. Anton, S.D.; Morrison, C.D.; Cefalu, W.T.; Martin, C.K.; Coulon, S.; Geiselman, P.; Han, H.; White, C.L.; Williamson, D.A. Effects of chromium picolinate on food intake and satiety. *Diabetes Technology & Therapeutics* **2008**, *10*, 405-412, doi:10.1089/dia.2007.0292.
 156. Jamilian, M.; Zadeh Modarres, S.; Amiri Siavashani, M.; Karimi, M.; Mafi, A.; Ostadmohammadi, V.; Asemi, Z. The influences of chromium supplementation on glycemic control, markers of cardio-metabolic risk, and oxidative stress in infertile polycystic ovary syndrome women candidate for in vitro fertilization: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Biological Trace Element Research* **2018**, *185*, 48-55, doi:10.1007/s12011-017-1236-3.
 157. Fazelian, S.; Rouhani, M.H.; Bank, S.S.; Amani, R. Chromium supplementation and polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Trace Elements in Medicine Biology* **2017**, *42*, 92-96, doi:10.1016/j.jtemb.2017.04.008.
 158. Anderson, R.A.; Cefalu, W.T. Chromium. In *Encyclopedia of dietary supplements* 2nd ed.; Informa Healthcare: New York, NY, 2010.
 159. Wilbur, S.; Abadin, H.; Fay, M.; Yu, D.; Tencza, B.; Ingerman, L.; Wilbur, S.; Abadin, H.; Fay, M.; Yu, D. Toxicological profile for chromium. *Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry* **2012**, *24049864*, 592.
 160. Cieślak-Golonka, M. Toxic and mutagenic effects of chromium(VI). A review. *Polyhedron* **1996**, *15*, 3667-3689, doi:10.1016/0277-5387(96)00141-6.
 161. Brauer, S.L.; Hneihen, A.S.; McBride, J.S.; Wetterhahn, K.E. Chromium(VI) forms thiolate complexes with gamma-glutamylcysteine, N-acetylcysteine, cysteine, and the

- methyl ester of N-acetylcysteine. *Inorganic Chemistry* **1996**, 35, 373-381, doi:10.1021/ic941452d.
162. Farri, R.; Gimino, M.J.; Lagarda, M.J. The occurrence of chromium in raw materials and its fate in the brewing process. *Journal of the Institute of Brewing* **1987**, 93, 394-395, doi:10.1002/j.2050-0416.1987.tb04524.x.
163. Vieira, E.; Soares, M.E.; Kozior, M.; Krejpcio, Z.; Ferreira, I.M.; Bastos, M.L. Quantification of total and hexavalent chromium in lager beers: variability between styles and estimation of daily intake of chromium from beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62, 9195-9200, doi:10.1021/jf502657n.
164. Anderson, R.A.; Bryden, N.A. Concentration, insulin potentiation, and absorption of chromium in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1983**, 31, 308-311, doi:10.1021/jf00116a031.
165. Marcano, E.; Gómez, C.; Benzo, Z.; Laine, J. Estudio preliminar sobre la determinación de elementos traza en cervezas venezolanas por ICP-OES. *Química Nova* **2010**, 33, 653-655, doi:10.1590/s0100-40422010000300032.
166. Lara, C. Belgian Blond Ale. Available online: <https://www.hominilupulo.com.br/belgian-blond-ale/> (accessed on 2 ago. 2021).
167. da Costa Fulgêncio, A.C.; Resende, G.A.P.; Teixeira, M.C.F.; Botelho, B.G.; Sena, M.M. Determination of alcohol content in beers of different styles based on portable near-infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Food Analytical Methods* **2021**, 15, 307-316, doi:10.1007/s12161-021-02126-w.
168. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A.; Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* **1956**, 28, 350-356, doi:10.1021/ac60111a017.
169. Fukuda, N. Apparent diameter and cell density of yeast strains with different ploidy. *Scientific Reports* **2023**, 13, 1513, doi:10.1038/s41598-023-28800-z.
170. Costa, P.M.C.; Almeida, I.L.M.L.; Bianchini, A.; Bianchini, M.G.A.; Vassoler e Silva, R.E.; Rossignoli, P.A. Blond ale craft beer production with addition of pineapple pulp. *Journal of Experimental Agriculture International* **2019**, 38, 1-5, doi:10.9734/jeai/2019/v38i230294.
171. Goiana, M.; Pinto, L.; Zambelli, R.; Miranda, K.; Pontes, D. Análises físico-químicas de cervejas artesanais pale ale comercializadas em Fortaleza, Ceará. In Proceedings of the XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Gramado, 2016.
172. Barros, C.R.; Ghesti, G.F. *Malte: essência da cerveja*, 1 ed.; Brasília, 2016; p. 30.
173. Foltinek, D. Brewing Story. Available online: <https://frontrange.ca/blog/2020/04/brewing-story/index.html> (accessed on 20/02/2024).
174. Spedding, G. The Oxford companion to beer definition of acidity. Available online: <https://beerandbrewing.com/dictionary/Bc3C4qEYz3/> (accessed on 21 out. 2021).
175. Carneiro, R.S. Elaboração de cerveja artesanal estilo saison ale contendo tamarindo. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, 2016.
176. Martins, C.; Brandao, T.; Almeida, A.; Rocha, S.M. Enlarging Knowledge on Lager Beer Volatile Metabolites Using Multidimensional Gas Chromatography. *Foods* **2020**, 9, doi:10.3390/foods9091276.
177. Paiva, A.C.; Simões Oliveira, D.; Hantao, L.W. A bottom-up approach for data mining in bioaromatization of beers using flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometry. *Separations* **2019**, 6, doi:10.3390/separations6040046.
178. Nolvachai, Y.; Amaral, M.S.S.; Herron, R.; Marriott, P.J. Solid phase microextraction for quantitative analysis – Expectations beyond design? *Green Analytical Chemistry* **2023**, 4, 100048, doi:10.1016/j.greeac.2022.100048.
179. da Costa Fulgêncio, A.C.; Resende, G.A.P.; Botelho, B.G. Chemometrics fundamentals and its applications in infrared spectroscopy. In *FTIR Spectroscopy: Advances in Research and Applications*, França, A.S., Oliveira, L.S., Eds.; 2022.
180. Sena, M.M.; Trevisan, M.G.; Poppi, R.J. PARAFAC: uma ferramenta quimiométrica para tratamento de dados multidimensionais. Aplicações na determinação direta de

- fármacos em plasma humano por espectrofluorimetria. *Química Nova* **2005**, 28, 910-920, doi:10.1590/s0100-40422005000500032.
181. Wold, S.; Geladi, P.; Esbensen, K.; Öhman, J. Multi-way principal components-and PLS-analysis. *Journal of Chemometrics* **1987**, 1, 41-56, doi:10.1002/cem.1180010107.
182. Molloy, M.; Martin, E.B. Application of multiway principal component analysis for identification of process improvements in pharmaceutical manufacture. *IFAC Proceedings Volumes* **2013**, 46, 283-288, doi:10.3182/20131218-3-in-2045.00016.
183. Ventura, G.T.; Hall, G.J.; Nelson, R.K.; Frysinger, G.S.; Raghuraman, B.; Pomerantz, A.E.; Mullins, O.C.; Reddy, C.M. Analysis of petroleum compositional similarity using multiway principal components analysis (MPCA) with comprehensive two-dimensional gas chromatographic data. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 2584-2592, doi:10.1016/j.chroma.2011.03.004.
184. Lopes, J.A.; Menezes, J.C. Multivariate monitoring of fermentation processes with non-linear modelling methods. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 515, 101-108, doi:10.1016/j.aca.2004.01.060.
185. Emparán, M.; Simpson, R.; Almonacid, S.; Teixeira, A.; Urtubia, A. Early recognition of problematic wine fermentations through multivariate data analyses. *Food Control* **2012**, 27, 248-253, doi:10.1016/j.foodcont.2012.03.029.
186. van Mispelaar, V.G.; Tas, A.C.; Smilde, A.K.; Schoenmakers, P.J.; van Asten, A.C. Quantitative analysis of target components by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2003**, 1019, 15-29, doi:10.1016/j.chroma.2003.08.101.
187. Pierce, K.M.; Hope, J.L.; Hoggard, J.C.; Synovec, R.E. A principal component analysis based method to discover chemical differences in comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry (GCxGC-TOFMS) separations of metabolites in plant samples. *Talanta* **2006**, 70, 797-804, doi:10.1016/j.talanta.2006.01.038.
188. Wise, B.M.; Gallagher, N.B.; Bro, R.; Shaver, J.M.; Windig, W.; Koch, R.S. *Chemometrics Tutorial for PLS_Toolbox and Solo*; Eigenvector Research: Wenatchee, 2006; p. 420.
189. Perveen, S.; Al-Taweel, A. *Terpenes and terpenoids*; BoD—Books on Demand: 2018.
190. Stevens, R. The chemistry of hop constituents. *Chemical Reviews* **1967**, 67, 19-71, doi:10.1021/cr60245a002.
191. Takoi, K.; Koie, K.; Itoga, Y.; Katayama, Y.; Shimase, M.; Nakayama, Y.; Watari, J. Biotransformation of hop-derived monoterpene alcohols by lager yeast and their contribution to the flavor of hopped beer. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **2010**, 58, 5050-5058, doi:10.1021/jf1000524.
192. Verstrepren, K.J.; Derdelinckx, G.; Dufour, J.-P.; Winderickx, J.; Thevelein, J.M.; Pretorius, I.S.; Delvaux, F.R. Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2003**, 96, 110-118, doi:10.1016/s1389-1723(03)90112-5.
193. Callao, M.P.; Ruisánchez, I. An overview of multivariate qualitative methods for food fraud detection. *Food Control* **2018**, 86, 283-293, doi:10.1016/j.foodcont.2017.11.034.
194. Medina, K.; Giannone, N.; Dellacassa, E.; Schinca, C.; Carrau, F.; Boido, E. Commercial craft beers produced in Uruguay: Volatile profile and physicochemical composition. *Food Res. Int.* **2023**, 164, 112349, doi:10.1016/j.foodres.2022.112349.
195. Gonçalves Bortoleto, G.; Pinheiro Claro Gomes, W. Monitoring of organic volatile compounds in craft beers during fermentative process. *Journal of microbiology, biotechnology and food sciences* **2022**, 11, doi:10.55251/jmbfs.4761.
196. Ramsey, I.; Yang, Q.; Fisk, I.; Ayed, C.; Ford, R. Assessing the sensory and physicochemical impact of reverse osmosis membrane technology to dealcoholize two different beer styles. *Food Chem X* **2021**, 10, 100121, doi:10.1016/j.fochx.2021.100121.
197. Moir, M. Hops—a millennium review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2018**, 58, 131-146, doi:10.1094/asbcj-58-0131.

-
198. Steenackers, B.; De Cooman, L.; De Vos, D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: a review. *Food Chemistry* **2015**, *172*, 742-756, doi:10.1016/j.foodchem.2014.09.139.
199. Research, M. Global hops market - 2023-2030. Available online: <https://www.marketresearch.com/DataM-Intelligence-4Market-Research-LLP-v4207/Global-Hops-34833012/> (accessed on 25 Sep 2023).
200. Cattoor, K.; Dresel, M.; De Bock, L.; Boussey, K.; Van Bocxlaer, J.; Remon, J.-P.; De Keukeleire, D.; Deforce, D.; Hofmann, T.; Heyerick, A. Metabolism of hop-derived bitter acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 7916-7924, doi:10.1021/jf300018s.
201. Knez Hrnič, M.; Španinger, E.; Košir, I.J.; Knez, Ž.; Bren, U. Hop compounds: extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. *Nutrients* **2019**, *11*, 257, doi:10.3390/nu11020257.
202. King, A.J.; Dickinson, J.R. Biotransformation of hop aroma terpenoids by ale and lager yeasts. *FEMS Yeast Research* **2003**, *3*, 53-62, doi:10.1016/s1567-1356(02)00141-1.
203. Guimarães, B.P.; Nascimento, P.G.B.D.; Ghesti, G.F. Intellectual property and plant variety protection: prospective study on hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars. *World Patent Information* **2021**, *65*, 102041, doi:10.1016/j.wpi.2021.102041.
204. Afendi, F.M.; Okada, T.; Yamazaki, M.; Hirai-Morita, A.; Nakamura, Y.; Nakamura, K.; Ikeda, S.; Takahashi, H.; Altaf-Ul-Amin, M.; Darusman, L.K.; et al. KNApSACk family databases: integrated metabolite-plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiology* **2012**, *53*, e1, doi:10.1093/pcp/pcr165.
205. Nezi, P.; Cicaloni, V.; Tinti, L.; Salvini, L.; Iannone, M.; Vitalini, S.; Garzoli, S. Metabolomic and proteomic profile of dried hop Inflorescences (*Humulus lupulus* L. cv. Chinook and cv. Cascade) by SPME-GC-MS and UPLC-MS-MS. *Separations* **2022**, *9*, 204, doi:10.3390/separations9080204.
206. Fiehn, O.; Kopka, J.; Dormann, P.; Altmann, T.; Trethewey, R.N.; Willmitzer, L. Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature Biotechnology* **2000**, *18*, 1157-1161, doi:10.1038/81137.
207. Hughey, C.A.; McMinn, C.M.; Phung, J. Beeromics: from quality control to identification of differentially expressed compounds in beer. *Metabolomics* **2016**, *12*, 1-13, doi:10.1007/s11306-015-0885-5.
208. Ikhalaynen, Y.A.; Plyushchenko, I.V.; Rodin, I.A. Hopomics: *Humulus lupulus* brewing cultivars classification based on LC-MS profiling and nested feature selection. *Metabolites* **2022**, *12*, 945, doi:10.3390/metabo12100945.
209. Brendel, R.; Schwolow, S.; Rohn, S.; Weller, P. Gas-phase volatilomic approaches for quality control of brewing hops based on simultaneous GC-MS-IMS and machine learning. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2020**, *412*, 7085-7097, doi:10.1007/s00216-020-02842-y.
210. Fiehn, O. Metabolomics by gas chromatography-mass spectrometry: combined targeted and untargeted profiling. *Current Protocols in Molecular Biology* **2016**, *114*, 30.34.31-30.34.32, doi:10.1002/0471142727.mb3004s114.
211. Liu, Z.; Wang, L.; Liu, Y. Rapid differentiation of Chinese hop varieties (*Humulus lupulus*) using volatile fingerprinting by HS-SPME-GC-MS combined with multivariate statistical analysis. *Journal of Science Food and Agriculture* **2018**, *98*, 3758-3766, doi:10.1002/jsfa.8889.
212. Wong, Y.F.; Perlmutter, P.; Marriott, P.J. Untargeted metabolic profiling of *Eucalyptus* spp. leaf oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography with high resolution mass spectrometry: Expanding the metabolic coverage. *Metabolomics* **2017**, *13*, 46, doi:10.1007/s11306-017-1173-3.
213. Amaral, M.S.S.; Hearn, M.T.W.; Marriott, P.J. Lipase-catalysed changes in essential oils revealed by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2023**, *415*, 3189-3199, doi:10.1007/s00216-023-04729-0.

-
214. Su, X.; Yin, Y. Aroma characterization of regional Cascade and Chinook hops (*Humulus lupulus* L.). *Food Chemistry* **2021**, *364*, 130410, doi:10.1016/j.foodchem.2021.130410.
215. Van Opstaele, F.; De Causmaecker, B.; Aerts, G.; De Cooman, L. Characterization of novel varietal floral hop aromas by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry/olfactometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 12270-12281, doi:10.1021/jf304421d.
216. Marriott, P.J.; Massil, T.; Hugel, H. Molecular structure retention relationships in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Separation Science* **2004**, *27*, 1273-1284, doi:10.1002/jssc.200401917.
217. Marriott, P.J.; Resende, G.A.P. GC×GC technology for non-targeted analysis of volatile compounds It just makes sense. *Wiley Analytical Science Magazine* **2023**, *3*(May), 29-34.
218. Wong, Y.F.; Marriott, P.J. Approaches and challenges for analysis of flavor and fragrance volatiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *65*, 7305-7307, doi:10.1021/acs.jafc.7b03112.
219. Champagne, A.; Boutry, M. A comprehensive proteome map of glandular trichomes of hop (*Humulus lupulus* L.) female cones: Identification of biosynthetic pathways of the major terpenoid-related compounds and possible transport proteins. *Proteomics* **2017**, *17*, 1600411, doi:10.1002/pmic.201600411.
220. Eriksen, R.L.; Padgitt-Cobb, L.K.; Townsend, M.S.; Henning, J.A. Gene expression for secondary metabolite biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.) leaf lupulin glands exposed to heat and low-water stress. *Scientific Reports* **2021**, *11*, 5138, doi:10.1038/s41598-021-84691-y.
221. Wang, G.; Tian, L.; Aziz, N.; Broun, P.; Dai, X.; He, J.; King, A.; Zhao, P.X.; Dixon, R.A. Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. *Plant Physiology* **2008**, *148*, 1254-1266, doi:10.1104/pp.108.125187.
222. Howard, G.A.; Slater, C.A. Evaluation of hops VII. Composition of the essential oil of hops. *Journal of the Institute of Brewing* **1957**, *63*, 491-506, doi:10.1002/j.2050-0416.1957.tb06290.x.
223. Rutnik, K.; Knez Hrncič, M.; Jože Košir, I. Hop essential oil: Chemical composition, extraction, analysis, and applications. *Food Reviews International* **2021**, *38*, 529-551, doi:10.1080/87559129.2021.1874413.
224. Móricz, Á.M.; Bartoszek, M.; Polak, J.; Marczevska, P.; Knaś, M.; Böszörményi, A.; Fodor, J.; Kowalska, T.; Sajewicz, M. A comparison of quantitative composition and bioactivity of oils derived from seven North American varieties of hops (*Humulus lupulus* L.). *Separations* **2023**, *10*, 402, doi:10.3390/separations10070402.
225. Buglass, A.J.; Caven-Quantrill, D.J. Applications of natural ingredients in alcoholic drinks. In *Natural Food Additives, Ingredients and Flavours*; 2012; pp. 358-416.
226. Montanari, L.; Floridi, S.; Marconi, O.; Tironzelli, M.; Fantozzi, P. Effect of mashing procedures on brewing. *European Food Research and Technology* **2005**, *221*, 175-179, doi:10.1007/s00217-005-1166-8.
227. Kühbeck, F.; Back, W.; Krottenthaler, M. Influence of lauter turbidity on wort composition, fermentation performance and beer quality - A review. *Journal of the Institute of Brewing* **2006**, *112*, 215-221, doi:10.1002/j.2050-0416.2006.tb00716.x.
228. Gordon, R.; Power, A.; Chapman, J.; Chandra, S.; Cozzolino, D. A review on the source of lipids and their interactions during beer fermentation that affect beer quality. *Fermentation* **2018**, *4*, doi:10.3390/fermentation4040089.
229. Deindorfer, F.H. Fermentation kinetics and model processes. *Advances in Applied Microbiology* **1960**, *2*, 321-334, doi:10.1016/s0065-2164(08)70134-5.
230. Reid, S.J.; Josey, M.; MacIntosh, A.J.; Maskell, D.L.; Alex Speers, R. Predicting fermentation rates in ale, lager and whisky. *Fermentation* **2021**, *7*, doi:10.3390/fermentation7010013.
231. Hiss, H. Cinética de processos fermentativos. In *Biotechnologia Industrial: engenharia bioquímica*; Blücher: São Paulo, 2001.

Apêndices e Anexos

Apêndice A

A.1. Produção do mosto

A.1.1. Moagem

A moagem é a etapa em que ocorre a quebra dos grãos e exposição do material amiláceo. Esse processo tem influência direta na qualidade, rendimento e clarificação do produto, além de afetar a velocidade das transformações físico-químicas da cerveja [15]. Existem dois objetivos principais, separar a casca com rasgagem de forma longitudinal e realizar a moagem do endosperma, ocorrendo o aumento da superfície de contato com as enzimas presentes no malte. É preferencial que a casca seja separada na sua forma inteira, pois ela atua como agente filtrante na clarificação, enquanto a sua retirada é importante para exposição do endosperma [4,12]. O endosperma é a região a ser moída para liberação da fonte de carbono e para uma melhor atuação enzimática. A moagem do endosperma deve ocorrer com a mínima formação de farinhas de granulometria muito fina, evitando-se a formação de pasta na solução [12,226].

Geralmente são usados moinhos do tipo rolo ou martelo, a depender do tipo de modificação do malte. Os moinhos de rolo podem ter 2 ou 6 rolos, onde o malte é comprimido pelo meio de movimento circular com regulagem da distância entre rolos e com o propósito de causar menor dano à casca [11,15]. Já o moinho de martelo causa uma maior destruição da casca, com alta cominuição do malte e, neste caso, normalmente necessita-se do uso de filtro de prensa para melhor separação do líquido [15].

O processo de moagem pode ocorrer por via seca e via úmida, onde a umidade é utilizada para amolecer a casca, facilitando sua retirada. Apesar do uso majoritário de moagem a seco, a umidificação do malte pode ser interessante em certos casos, acontecendo com uso de água ou vapor antes da trituração [11].

A.1.2. Mosturação

A mosturação, ou brassagem, se inicia com a mistura de água e malte moído, tendo diversas modificações benéficas para o processo de fermentação. Desta forma, ocorre o processo de solubilização dos constituintes do malte, a ação enzimática e formação do extrato, ou seja, a dissolução de sólidos em água cervejeira. O extrato do malte é constituído por uma pequena parte de substâncias solúveis em água (10-15%),

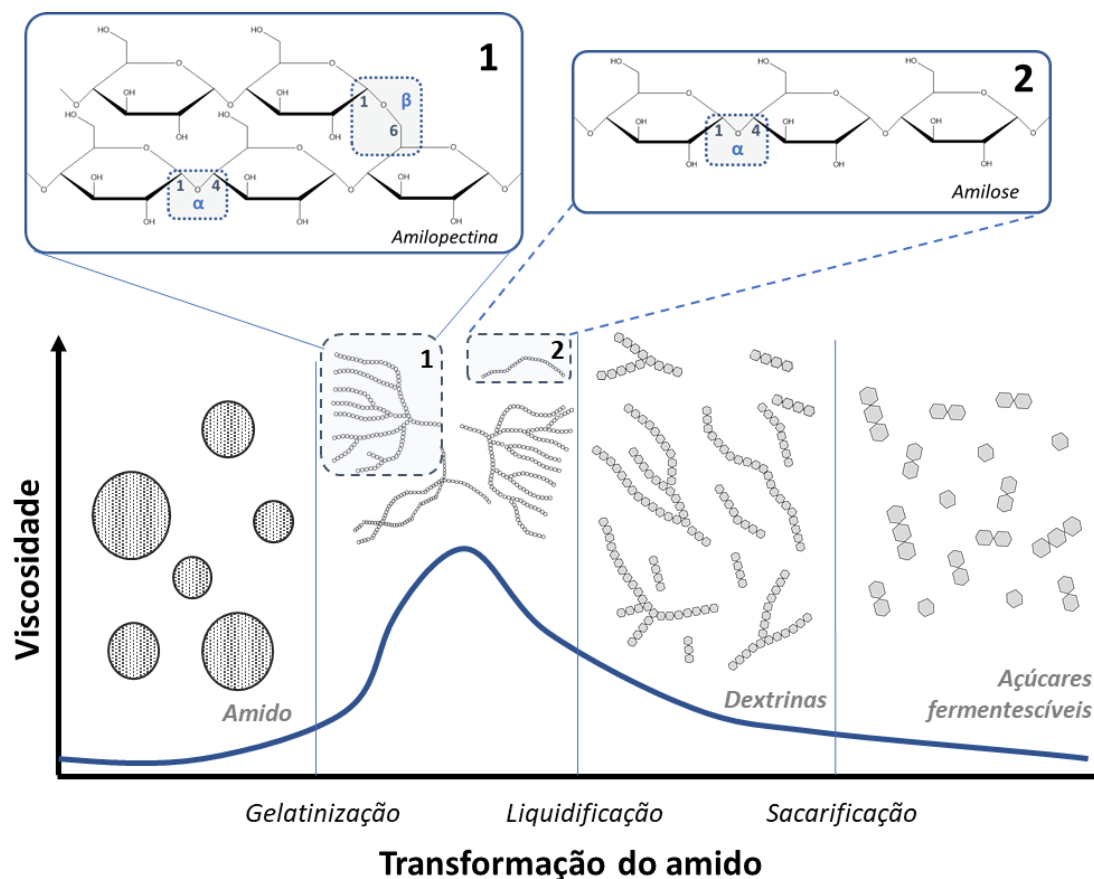
enquanto o restante do extrato é constituído por substâncias degradadas via ação enzimática [11,15].

Um amplo conjunto de reações enzimáticas ocorrem nesta etapa: degradação de β -glucanos, quebra de proteínas, degradação do amido e conversão de ácidos graxos. As reações têm seu início com a produção das enzimas durante o processo de maltagem, mas é na brassagem que ocorre a amplificação do seu funcionamento [15].

Os β -glucanos são hemiceluloses formadas por monossacarídeos de D-glicose com ligações β -glicosídicas e são componentes das paredes celulares. Sua degradação ocorre majoritariamente pela citólise na etapa de malteação, porém pode haver presença de β -glucanos que serão degradados durante a mosturação. A presença desse composto pode ser prejudicial durante a filtração, uma vez que essa hemicelulose pode formar géis pela ligação de hidrogênio consigo mesma [12,35].

A quebra de proteínas ocorre por duas enzimas proteolíticas presentes no malte: endopeptidases e exopeptidases. Em ambas as enzimas, ocorre clivagem de ligação peptídica, com sua diferenciação pelo sentido da clivagem, ou seja, exopeptidases ocorrem em aminoácidos terminais, enquanto as endopeptidases atuam dentro da molécula. As endopeptidases realizam a clivagem de proteínas em peptídeos de alto peso molecular. E as exopeptidases realizam a clivagem de carboxilas ou aminas terminais, presentes nos peptídeos, gerando FAN (amino nitrogênio livre) [12,15,35].

Já o amido, pode ser degradado em açúcares fermentescíveis (principalmente maltose e maltotriose) e dextrinas de cadeia curta. Sua degradação ocorre conforme **Figura A.1** com as etapas de gelatinização, liquidificação e sacarificação. A gelatinização é a primeira etapa, onde a água quente atua sobre os grânulos de amido embalados e conseqüentemente acontece o inchamento e abertura do amido. A gelatinização do malte começa com temperaturas entre 59 e 65 °C e conversão dos grânulos em amilose e amilopectina. Na fase de liquidificação, enzimas atuam degradando estes componentes em dextrinas, principalmente a enzima α -amilase. E é na sacarificação que são produzidos os açúcares fermentescíveis, principalmente a partir de α -amilase, β -amilase e limite dextrinase [10,11].

Figura A.1: Processo de conversão de amido em açúcares fermentescíveis.

A enzima α -amilase realiza a quebra de ligações α (1,4) presentes em amilopectinas e amiloses, formando dextrinas com 5 a 7 monômeros de glicose. A β -amilase realiza a conversão dos amidos em maltose e a limite dextrinase cliva ligações β (1,6), formando-se dextrinas lineares. Durante a degradação de amidos, a viscosidade do mosto é modificada, conforme a presença dos tipos de carboidratos em solução, atingindo a maior viscosidade após a etapa de gelatinização [2,12].

Apesar de enzimas lipases já terem realizado um pouco da degradação de lipídios durante a maltagem, a conversão de lipídios também ocorre. As enzimas lipoxigenases atuam durante a brassagem e convertem majoritariamente ácidos graxos insaturados em glicerina e ácidos graxos hidroxilados [15]. Estes ácidos são importantes precursores em compostos de sabor durante o envelhecimento da bebida, dando origem a 'carboxilas de envelhecimento' a partir de auto-oxidação ou pela ação de peroxidase em presença de oxigênio. Um exemplo destes compostos é o trans-2-nonenal com o descritor de sabor de papelão ou papel molhado e aroma de bebida envelhecida [43].

Por fim, as rampas de aquecimento necessitam de controle de temperatura do mosto e aplicar rampas específicas para otimizar a atuação de enzimas no meio [11,15]. Cada enzima tem faixa de temperatura e pH ideal para uma melhor atuação enzimática, com uma função diferente (**Tabela A.1**), onde a presença de rampa com múltiplas temperaturas é interessante na brassagem.

Tabela A.1: Enzimas de interesse durante a produção de cervejas e perfil indicado de temperatura e pH para sua eficiência.

Enzima	Temperatura ótima	Faixa de pH ótimo	Função
α -amilase	70-74 °C	5,6-5,8	Decomposição de amido para dextrinas a partir de ligações α (1-4)
β -amilase	60-65 °C	5,4-5,5	Decomposição de amido em maltose
<i>Limit dextrinase</i>	55-60 °C	4,5-5,0	Decomposição de ligações β (1-6) presente em amilopectinas
Protease	47-54 °C	4,6-5,3	Decomposição de proteínas e redução da turvação da cerveja
Fitase	30-52 °C	5,0-5,5	Diminuição do pH no mosto
Peptidase	45-55 °C	4,6-5,3	Clivagem de ligações peptídicas e produção de FAN

Fonte: Kunze, 2004 [12]; Menezes e Silva, 2019 [23].

A.1.3. Clarificação

Ao término da mosturação, a clarificação deve ocorrer para remover a parte sólida insolúvel presente no mosto. Essa etapa ocorre com a separação dos resíduos insolúveis advindos do malte. A composição desses resíduos é formada de casca de malte, proteínas coaguladas, restos de parede celular, fragmentos de plúmula (parte do gérmen) e da camada de aleurona (células ricas em proteínas que recobrem o endosperma). Este conjunto de sólidos forma a torta de filtro (leito de filtração) que é usualmente empregada como meio de filtração gerando o primeiro mosto [15].

Após isso, ocorre o processo de percolação desse material com água quente com o objetivo de extrair os açúcares residuais e formar o mosto que será levado à fervura. Como a casca do malte é usada na torta, sua moagem não deve ser muito fina, como expresso em A.1.1. A água para percolação deve ser quente o suficiente para reduzir a viscosidade do mosto, mas não se recomenda ter temperaturas altas, já que elas surtem um efeito negativo na inativação de α -amilase (>80 °C) que é importante na sacarificação tardia e, por consequência, redução da turbidez de amido na cerveja final [12].

A.1.4. Fervura

A fervura é um processo com duração média de 60 a 90 min e possui o objetivo de conferir estabilidades bioquímicas, biológicas e coloidais [11,15]. É nesta etapa que ocorrem a redução da água, com concentração do mosto, e o seu escurecimento via reações de Maillard, com o escurecimento não enzimático que pode afetar a característica de cor e sabor do produto acabado. Há caramelização de açúcares, formação de melanoidinas (combinação de açúcares e proteínas via reação de Maillard) e taninos que trazem sensações agradáveis no aspecto sensorial com sabores e odores tais como *toffee* e noz [11].

Do ponto de vista microbiológico, ocorre redução da carga microbiana do mosto nesta etapa. A flora microbiana que resistiu às operações anteriores é destruída a partir da temperatura, do pH do mosto (~5,5) e de substâncias extraídas do lúpulo [4].

Nessa etapa também acontece a adição de lúpulo, ocorrendo junto com o início da fervura e em alguns casos podendo ser adicionado no final desta operação, como em casos de lúpulos aromáticos. A fervura irá converter os α -ácidos (**Tabela 2.1**, p.31) em compostos responsáveis pelo amargor, ou seja, irá ocorrer a isomerização desses ácidos em iso- α -ácidos [16].

As enzimas α -amilase são inativadas e ocorre a precipitação de proteínas e taninos com eliminação via coagulação e formação de *Trub*, um resíduo mucilaginoso semelhante a lodo, composto majoritariamente por proteínas e complexos de polifenóis [4].

A.1.5. Tratamento do mosto

Essa é a última etapa antes da fermentação e ela é importante para conferir propriedades ao mosto que beneficiarão a etapa de fermentação e o produto acabado [12]. Um dos objetivos dessa etapa é a eliminação de componentes que causam a turbidez da cerveja, via remoção de *trub* e o resfriamento do mosto. O *trub* se apresenta no mosto e precisa ser separado para melhorar aspectos sensoriais e de qualidade do produto. Como esse material se encontra em suspensão, é necessário o uso de procedimento de *whirlpool*, que se baseia na formação de um redemoinho para decantar os materiais no centro do recipiente empregado. Já o resfriamento ocorre com redução da temperatura de cerca de 100 °C para temperaturas próximas a 25 °C. Para o resfriamento podem ser usados trocadores de calor de duplo tubo, casco e tubo e de placas, assim como o uso convencional de serpentinas por microcervejarias [12,227].

Já a aeração do mosto auxilia no crescimento do número de leveduras, na respiração, assim como na síntese de ácidos graxos insaturados e esteróis que farão parte da membrana intracelular [228].

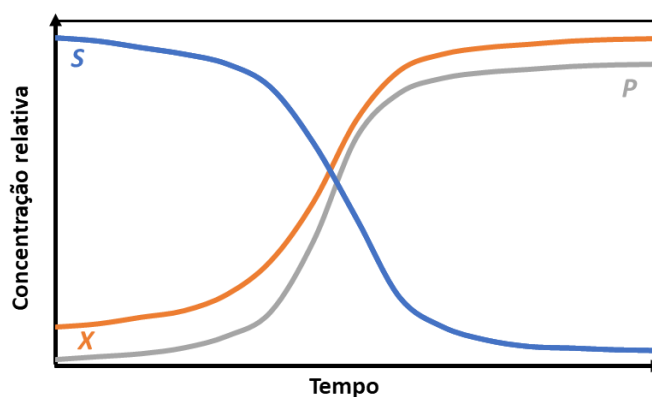
A.2. Fermentação

A.2.1. Cinética de fermentação

O processo fermentativo é uma etapa complexa que envolve diversas reações com ocorrência concomitante. Estas reações vão descrever como o processo fermentativo ocorre, caracterizando algumas das reações no meio. Para descrever melhor este processo, modelos matemáticos da cinética de fermentação podem apresentar o que está acontecendo no mosto [229,230].

De modo geral, os fenômenos podem ser representados por três descritores importantes: o substrato (S), o inóculo (X) e o produto (P). Com estes três componentes é possível entender as mudanças de crescimento da biomassa, consumo do substrato e aumento da concentração do produto [231]. De modo geral, a fermentação assume o comportamento apresentado pela **Figura A.2**, onde geralmente, P é representado pelo etanol, S pelos açúcares e X pela levedura.

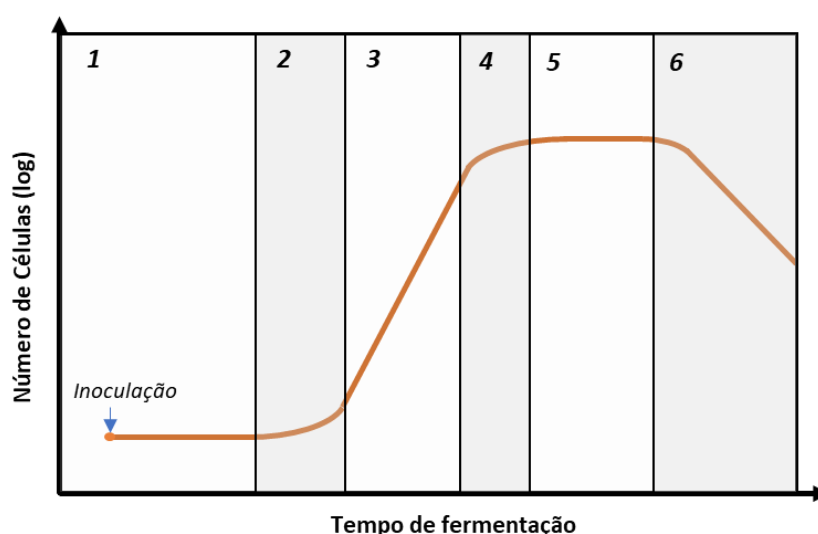
Figura A.2: Perfil cinético de fermentação a partir dos componentes substrato (S), inóculo (X) e produto (P).



O processo cinético de crescimento da população de microrganismos é subdividido em etapas de importância (**Figura A.3**). São seis etapas dentro do processo de crescimento microbiano: (1) *lag*, (2) de transição, (3) *log*, (4) de desaceleração, (5) estacionária e (6) declínio.

Após a inoculação de uma levedura, leva-se um certo tempo para se iniciar o crescimento do número de colônias, essa fase é nomeada fase *lag*. O tempo da fase *lag* depende das condições em que o microrganismo se encontra, tais como viabilidade, temperatura, aeração, cepa, idade da colônia, o meio em que a levedura se situa, entre outros fatores. Nesta etapa, também ocorre a preparação da levedura para o seu crescimento nas etapas posteriores, como o processo de respiração [23,231].

Figura A.3: Processo cinético de fermentação com base no crescimento de microrganismos (X) expresso pelo logaritmo no número de células, onde os estágios são apresentados como fases (1) “*lag*”, (2) de transição, (3) exponencial ou “*log*”, (4) de desaceleração, (5) estacionária e (6) declínio ou morte.



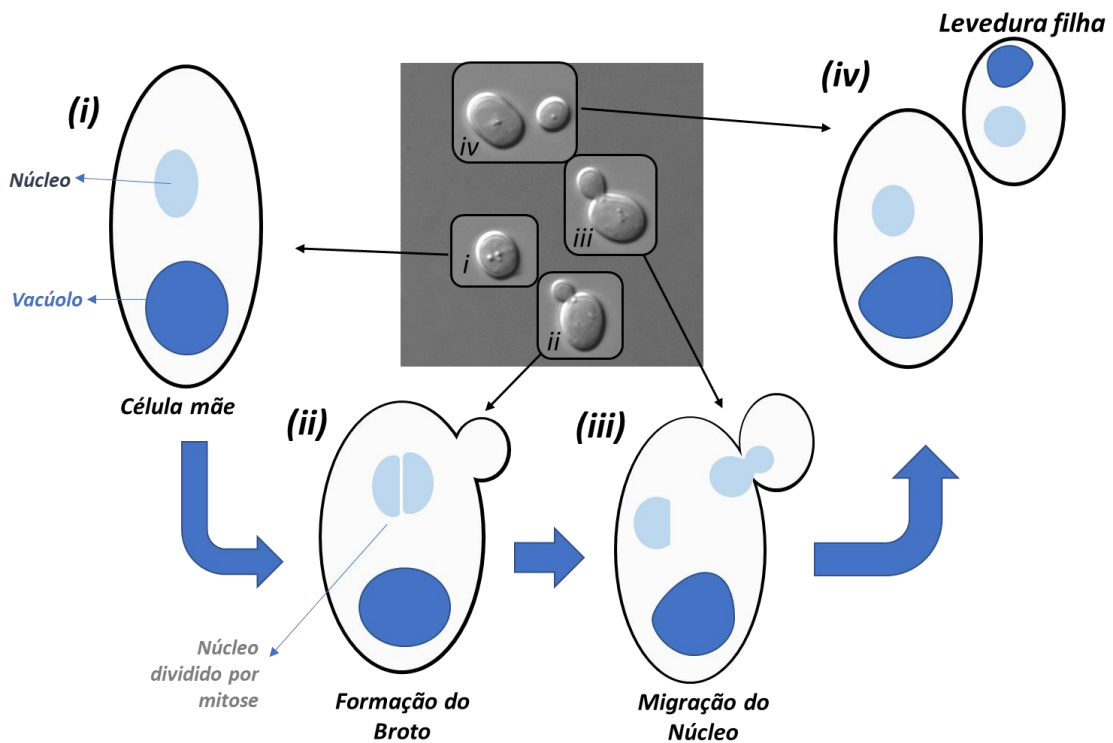
Não há aumento da biomassa na fase lag ($X=X_0$), porém na fase de aceleração, sua reprodução começa a ter aumento e começa a apresentar velocidade específica de crescimento (μ). Como reportado nas matérias primas (2.1.1.4), a levedura é a biomassa na fase de fermentação e sua reprodução ocorre a partir de um processo chamado “*budding*” ou brotamento, com novas leveduras brotando do corpo de outras leveduras (**Figura A.4**) [23,36]. O tempo médio de reprodução por *budding* é de cerca de 90 minutos, sendo considerado um bom tempo de duplicação, justificando sua presença em produções industriais [23].

A maior taxa de crescimento de leveduras ocorre na fase exponencial, também conhecida como fase log. Nesta fase, a população celular duplica-se em intervalos regulares e a sua duração irá depender do meio em que a fermentação ocorre, além da velocidade específica de crescimento ser constante e máxima ($\mu=\mu_m$) [231]. Há influência direta do ambiente, como temperatura, pH, composição do meio e presença

de oxigênio, assim como fatores genéticos e morfológicos da levedura irão influenciar no seu crescimento. Como exemplo, células menores possuem maior capacidade de permutar nutrientes e metabólitos de excreção, aumentando a taxa de crescimento e outras propriedades. Outra característica que pode ser exemplificada é a temperatura ideal de crescimento da levedura, em que leveduras com criotolerância preferem temperaturas mais baixas, como é o caso da *Saccharomyces pastorianus* [23]. Matematicamente, a velocidade de crescimento (μ) é diretamente proporcional à concentração de X (**Equação A.1**).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \quad (\text{A. 1})$$

Figura A.4: Processo de reprodução da levedura a partir do processo de brotamento ou Budding.



Após esta etapa, o inóculo começa a reduzir a taxa de reprodução durante a fase de desaceleração para uma posterior estabilização durante a fase estacionária. Este fenômeno pode ocorrer por dois fatores, limitação do crescimento do meio de cultura pela redução de substrato e pelo acúmulo de metabólitos inibidores. As velocidades de crescimento se reduzem até se anularem em um tempo final (t_f), dando início à fase estacionária [23,231].

É na fase estacionária que a concentração de inóculo atinge sua concentração máxima (X_m) e há um balanço entre crescimento e morte de leveduras, ocorrendo também a modificação das células [23].

Por fim, é na fase de declínio, conhecida também como fase de morte, que a velocidade de declínio das leveduras é maior que a velocidade de crescimento das mesmas, tendo uma maior concentração de microrganismos não viáveis para a fermentação. Normalmente, a taxa de morte celular é muito menor que a taxa de crescimento exponencial e células viáveis podem existir por meses ou anos [23].

Apêndice B – Informações complementares do Capítulo 3

B.1. Testes para o conjunto de etanol

Tabela A.2: Tratamento estatístico para o conjunto de dados etanol para o micronutriente de selênio.

Nutriente	Selênio	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =1	n _{final} =11
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,74	q = 2,95	q _{máx} (95%) = 3,80
Teste de homoscedasticidade (teste Bartlett)		
X ² _{calc} = 3,996	<	X ² _{tab} (95%)= 7,815
ANOVA		
F _{calc} = 47,834	>	F _{tab} (95%) = 4,347

Tabela A.3: Tratamento estatístico para o conjunto de dados etanol para o micronutriente de molibdênio.

Nutriente	Molibdênio	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 3,04	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,7190	<	C _{tab} (95%)= 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 27,158	>	F _{tab} (95%) = 4,066

Tabela A.4: Tratamento estatístico para o conjunto de dados etanol para o micronutriente de cromo.

Nutriente	Cromo	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =2	n _{final} =10
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,67	q = 2,76	q _{máx} (95%) = 3,66
Teste de homoscedasticidade (teste Bartlett)		
x ² _{calc} = 4,009	<	x ² _{tab} (95%)= 7,815
ANOVA		
F _{calc} = 122,823	>	F _{tab} (95%) = 4,757

B.2. Testes para o conjunto de dados de carboidratos totais**Tabela A.5:** Tratamento estatístico para o conjunto de dados carboidratos totais para o micronutriente de selênio.

Nutriente	Selênio	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 2,90	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,5360	<	C _{calc} (95%) = 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 40,115	>	F _{tab} (95%) = 4,066

Tabela A.6: Tratamento estatístico para o conjunto de dados carboidratos totais para o micronutriente de molibdênio.

Nutriente	Molibdênio	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 3,21	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,6836	<	C _{tab} (95%)= 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 13,806	>	F _{tab} (95%) = 4,066

Tabela A.7: Tratamento estatístico para o conjunto de dados carboidratos totais para o micronutriente de cromo.

Nutriente	Cromo	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =1	n _{final} =11
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,74	q = 2,75	q _{máx} (95%) = 3,80
Teste de homoscedasticidade (teste Bartlett)		
X ² _{calc} = 1,242	<	X ² _{tab} (95%)= 7,815
ANOVA		
F _{calc} = 257,320	>	F _{tab} (95%) = 4,347

B.3. Testes para o conjunto de dados de acidez total

Tabela A.8: Tratamento estatístico para o conjunto de dados acidez total para o micronutriente de selênio.

Nutriente	Selênio	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 2,87	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,3708	<	C _{calc} (95%) = 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 46,414	>	F _{tab} (95%) = 4,066

Tabela A.9: Tratamento estatístico para o conjunto de dados acidez total para o micronutriente de molibdênio.

Nutriente	Molibdênio	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =1	n _{final} =11
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,74	q = 3,03	q _{máx} (95%) = 3,80
Teste de homoscedasticidade (teste Bartlett)		
X ² _{calc} = 3,586	<	X ² _{tab} (95%) = 7,815
ANOVA		
F _{calc} = 45,422	>	F _{tab} (95%) = 4,347

Tabela A.10: Tratamento estatístico para o conjunto de dados acidez total para o micronutriente de cromo.

Nutriente	Cromo	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 2,93	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,4893	<	C _{tab} (95%) = 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 67,214	>	F _{tab} (95%) = 4,066

B.4. Testes para o conjunto de dados de acidez fixa

Tabela A.11: Tratamento estatístico para o conjunto de dados acidez fixa para o micronutriente de selênio.

Nutriente	Selênio	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 2,97	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,4993	<	C _{calc} (95%) = 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 0,638	<	F _{tab} (95%) = 4,066

Tabela A.12: Tratamento estatístico para o conjunto de dados acidez fixa para o micronutriente de molibdênio.

Nutriente	Molibdênio	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 3,25	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,4697	<	C _{tab} (95%) = 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 0,753	<	F _{tab} (95%) = 4,066

Tabela A.13: Tratamento estatístico para o conjunto de dados acidez fixa para o micronutriente de cromo.

Nutriente	Cromo	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =2	n _{final} =10
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,67	q = 3,20	q _{máx} (95%) = 3,685
Teste de homoscedasticidade (teste Bartlett)		
X ² _{calc} = 4,311	<	X ² _{tab} (95%) = 7,815
ANOVA		
F _{calc} = 0,070	<	F _{tab} (95%) = 4,757

B.5. Testes para o conjunto de dados de VDK

Tabela A.14: Tratamento estatístico para o conjunto de dados VDK para o micronutriente de selênio.

Nutriente	Selênio	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 3,10	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,5332	<	C _{calc} (95%) = 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 21,291	>	F _{tab} (95%) = 4,066

Tabela A.15: Tratamento estatístico para o conjunto de dados VDK para o micronutriente de molibdênio.

Nutriente	Molibdênio	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 3,02	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,4824	<	C _{tab} (95%) = 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 34,880	>	F _{tab} (95%) = 4,066

Tabela A.16: Tratamento estatístico para o conjunto de dados VDK para o micronutriente de cromo.

Nutriente	Cromo	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 3,26	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,6299	<	C _{tab} (95%) = 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 57,842	>	F _{tab} (95%) = 4,066

B.6. Testes para o conjunto de dados de FAN

Tabela A.17: Tratamento estatístico para o conjunto de dados FAN para o micronutriente de selênio.

Nutriente	Selênio	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 3,56	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,7351	<	C _{calc} (95%) = 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 4,310	>	F _{tab} (95%) = 4,066

Tabela A.18: Tratamento estatístico para o conjunto de dados FAN para o micronutriente de molibdênio.

Nutriente	Molibdênio	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 2,92	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,5419	<	C _{tab} (95%) = 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 11,818	>	F _{tab} (95%) = 4,066

Tabela A.19: Tratamento estatístico para o conjunto de dados FAN para o micronutriente de cromo.

Nutriente	Cromo	
Teste de outliers (teste Dixon)		
n _{inicial} = 12	n _{outliers} =0	n _{final} =12
Teste de normalidade (teste David)		
q _{min} (95%) = 2,80	q = 2,87	q _{máx} (95%) = 3,91
Teste de homoscedasticidade (teste Cochran)		
C _{calc} = 0,6953	<	C _{tab} (95%) = 0,7679
ANOVA		
F _{calc} = 9,258	>	F _{tab} (95%) = 4,347

B.7. PCA de características físico-químicas de cervejas *blond ale*.

Tabela A.20: Percentual de variância explicada pela PCA.

Componente Principal	Autovalores	% de variância da PC	% variância cumulativa
1	4,77	43,38	43,38
2	2,80	25,45	68,83
3	1,43	12,96	81,79
4	0,78	7,13	88,92
5	0,59	5,36	94,28
6	0,35	3,16	97,44
7	0,24	2,15	99,59
8	$3,81 \cdot 10^{-2}$	0,35	99,94
9	$7,02 \cdot 10^{-3}$	0,06	100,00

Figura A.5: Gráfico variância explicada versus número de componente principal aplicado em características físico-químicas de cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.

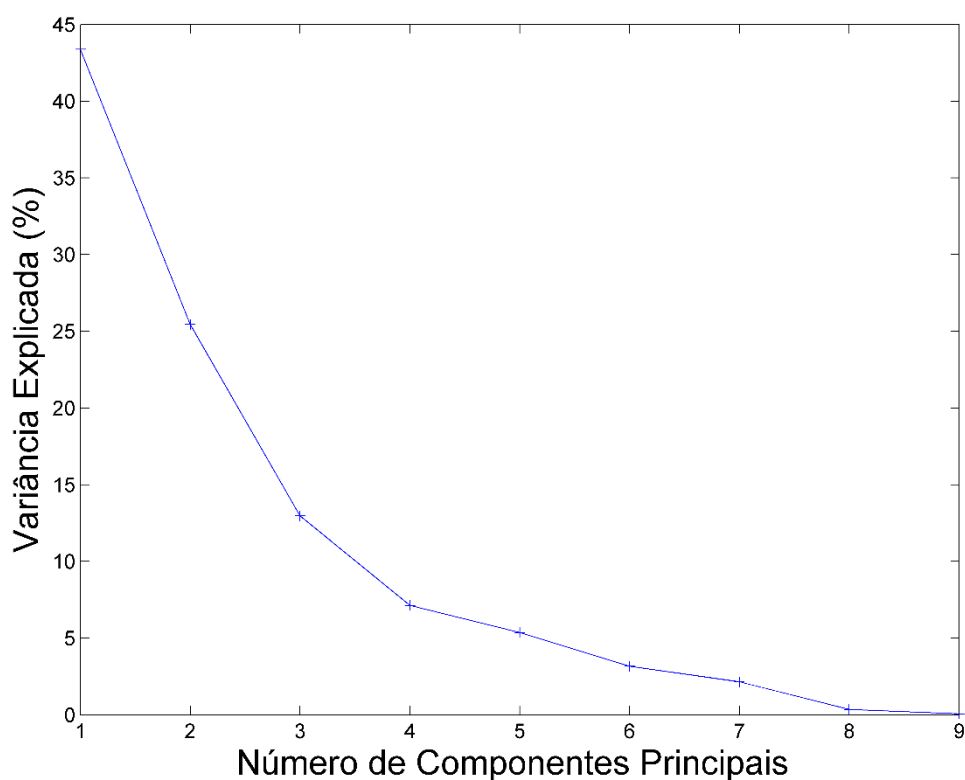


Figura A.6: Gráfico de hotelling T^2 versus Q residuais do modelo PCA aplicado em características físico-químicas de cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.

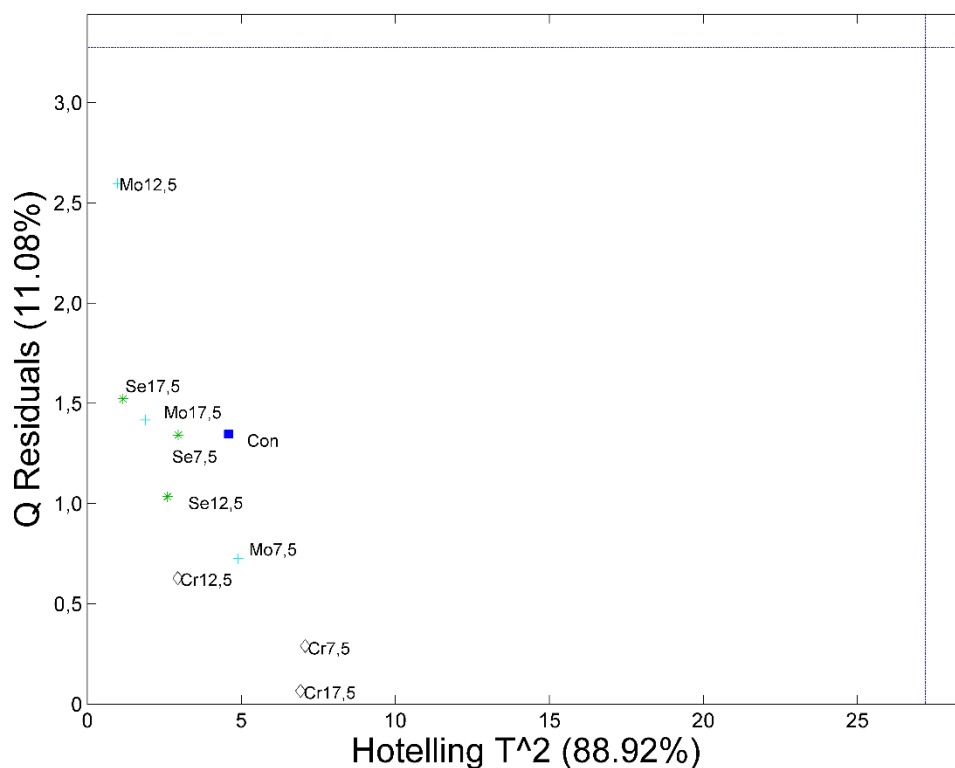


Figura A.7: Gráfico *biplot* de PC1xPC2 aplicado em características físico-químicas de cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.

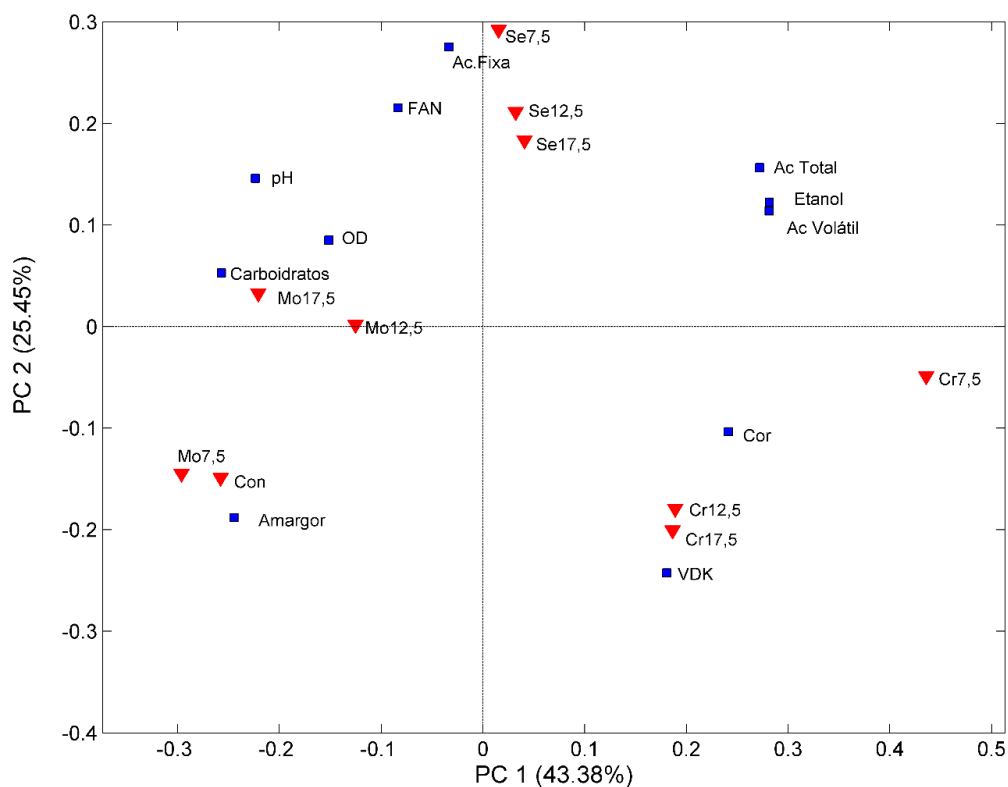


Figura A.8: Modelo de PCA entre PC1 e PC3 aplicado em características físico-químicas de cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.

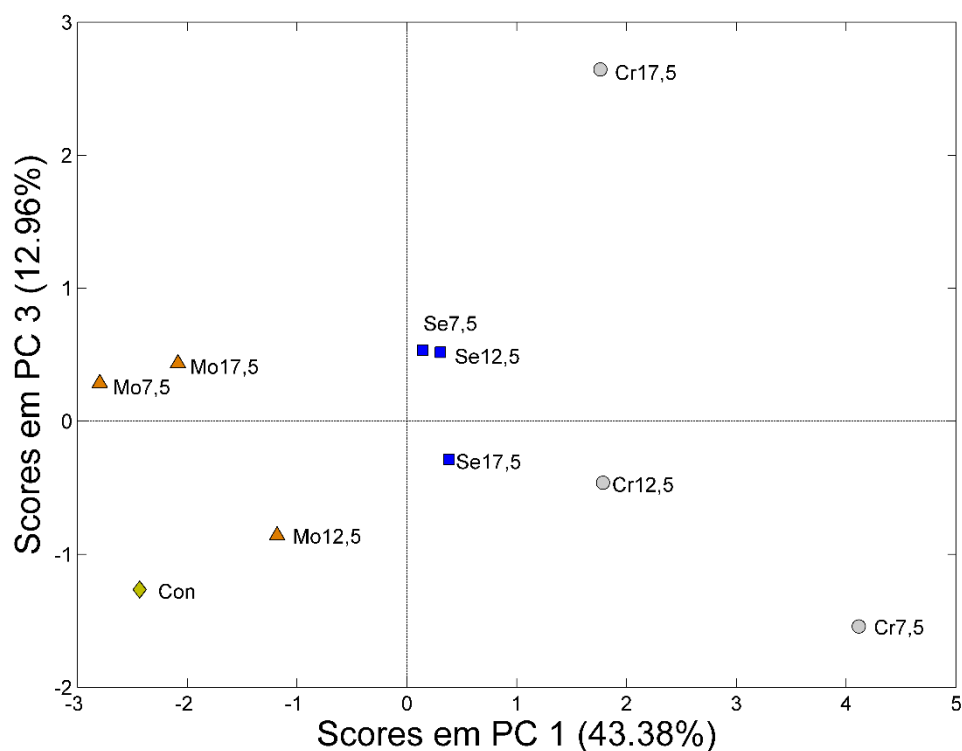


Figura A.9: Gráfico *loadings* de PC1xPC3 aplicado em características físico-químicas de cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.

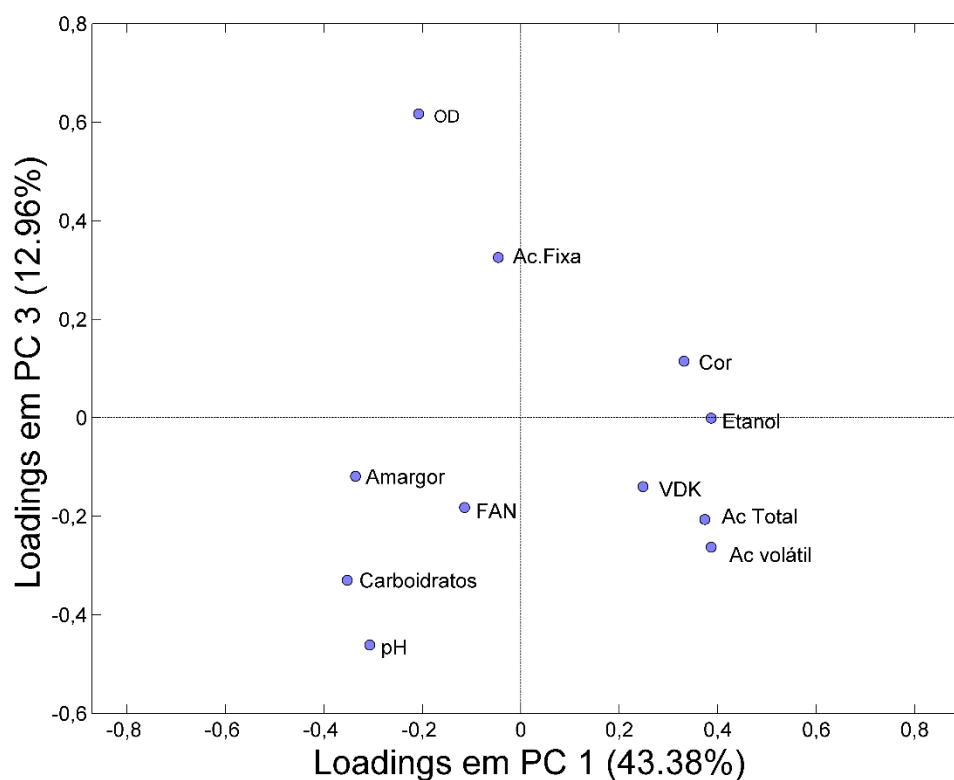


Figura A.10: Modelo de PCA entre PC1 e PC4 aplicado em características físico-químicas de cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.

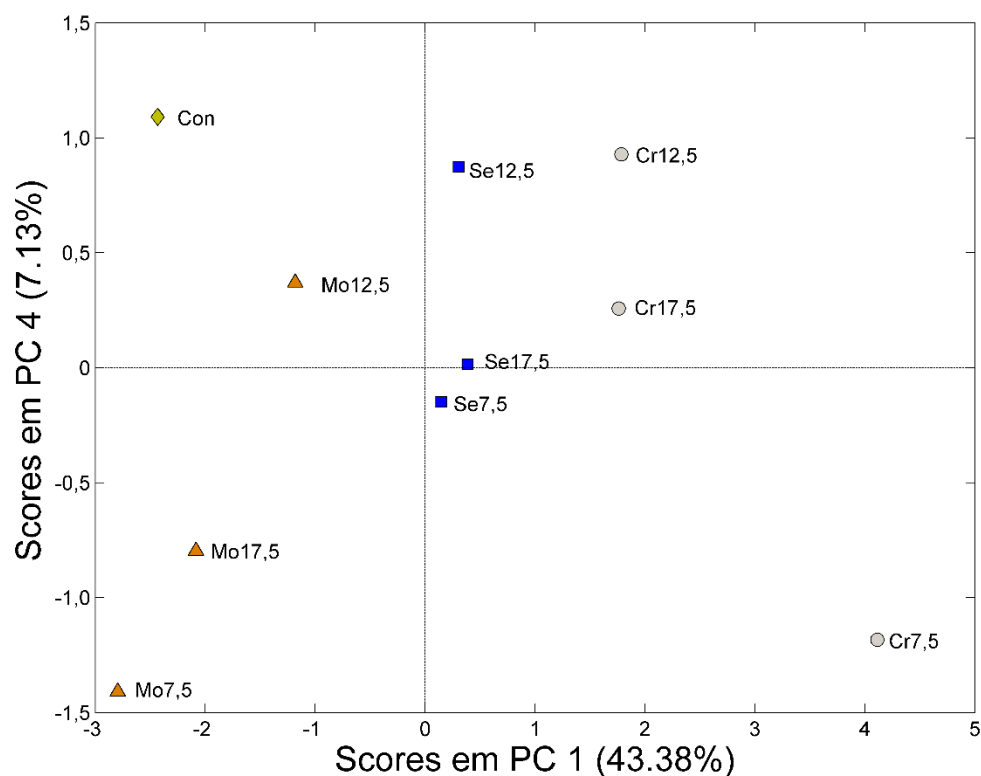
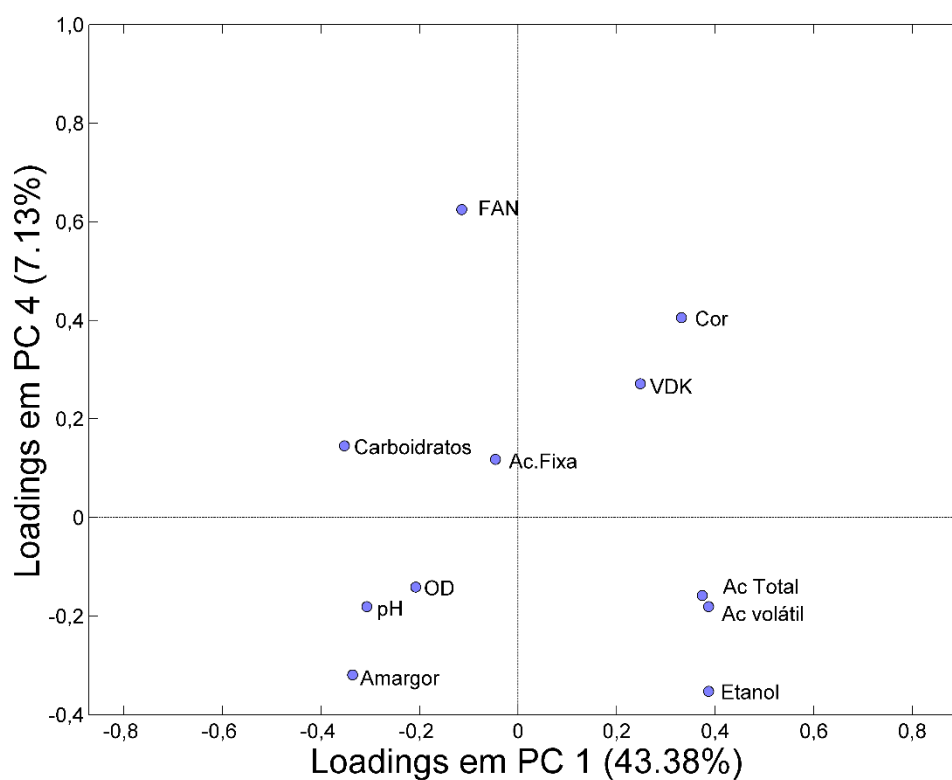


Figura A.11: Gráfico *loadings* de PC1xPC4 aplicado em características físico-químicas de cervejas *blond ale* com adição de 7,5%, 12,5% e 17,5% do valor de IDR de selênio, molibdênio e cromo.



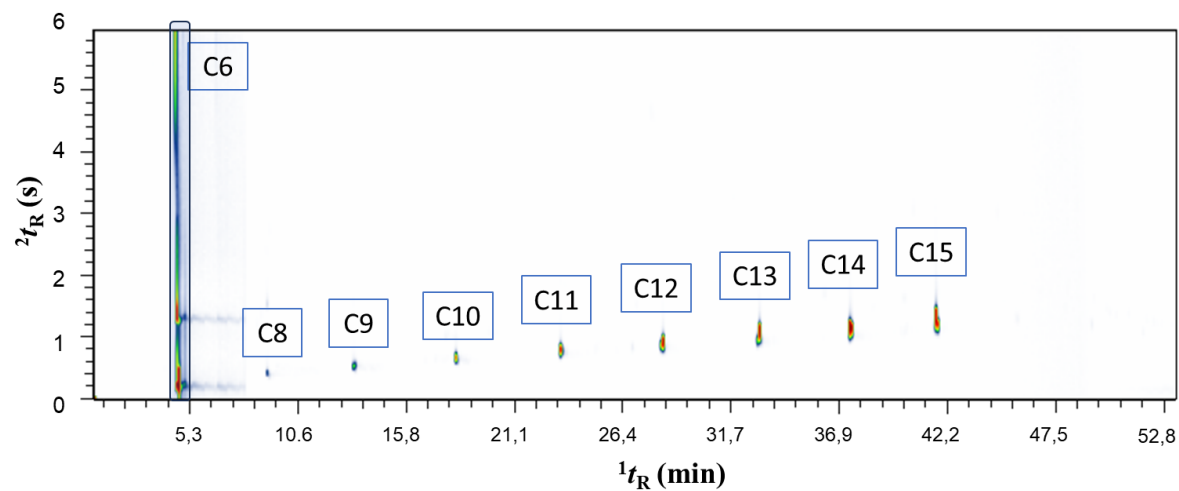
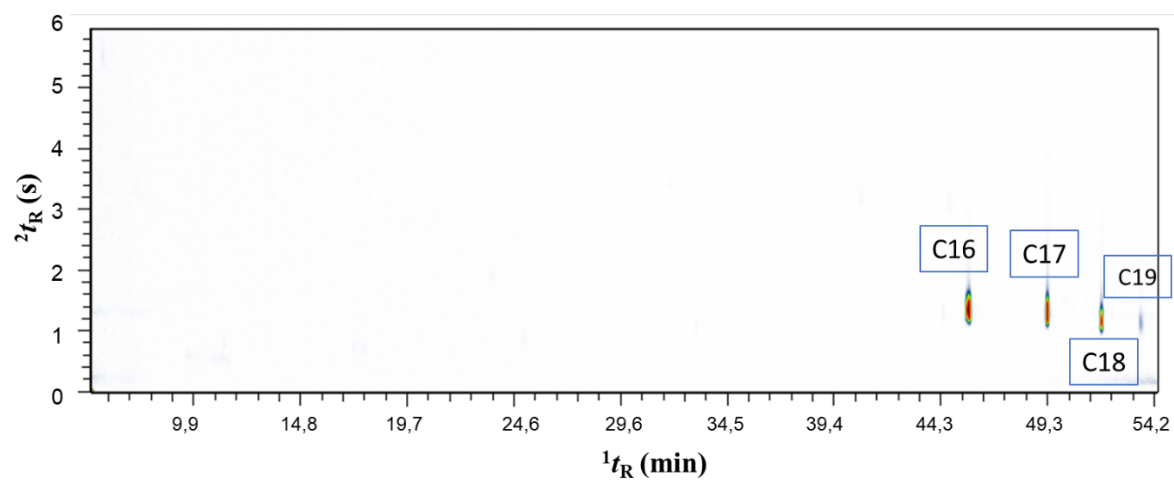
Apêndice C – Informações complementares do Capítulo 4**Figura A.12:** Cromatograma de GC×GC–MS por HS–SPME para a série de alcanos (C8-C15)**Figura A.13:** Cromatograma de GC×GC–MS por HS–SPME para a série de alcanos (C16-C21)

Tabela A.21: Compostos tentativamente identificados por HS-SPME-GC×GC-MS para mostos e amostras de cervejas controle do tipo Australian Pale Ale com (Au) e sem (AuH) a adição de lúpulo enigma (ENIG)

No.	1 ^o t _R (min)	2 ^o t _R (s)	Composto*	CAS	Fórmula	R Match	Lit. RI ^a	Exp. RI ^b	Área cromatográfica corrigida por I.S.				
									ENIG	Mosto Au	Cont Au	Mosto AuH	Cont AuH
1	9,16	1,01	Butanoato de etila	105-54-4	C6H12O2	911	802±2	800			0,133		0,125
2	9,16	1,72	Isobutenil metil cetona	141-79-7	C6H10O	748	798±4	800		0,005		0,008	
3	9,26	1,29	Hexanal	66-25-1	C6H12O	822	800±2	802	0,244	0,006		0,005	
4	10,66	4,21	Álcool isohexílico	626-89-1	C6H14O	878	846±8	837			0,009		0,018
5	11,06	0,97	2-metil-butanoato de etila	7452-79-1	C7H14O2	821	849±3	846					0,004
6	11,26	1,06	Isovalerato de etila	108-64-5	C7H14O2	733	854±2	851					0,003
7	11,36	0,96	Isobutirato de propila	644-49-5	C7H14O2	915	842±6	854	2,223			0,029	0,003
8	11,36	0,53	7-metil-1-octeno	13151-06-9	C9H18	816	847±0	854	0,188				
9	11,86	1,07	Propionato de isobutila	540-42-1	C7H14O2	805	866±2	866	2,400			0,031	
10	11,96	0,75	1-butoxi-1-etoxietano	57006-87-8	C8H18O2	795	872±NA	868					0,005
11	11,96	4,48	1-Hexanol	111-27-3	C6H14O	923	868±4	868	3,894		0,009	0,079	0,031
12	12,06	1,38	p-Xileno	106-42-3	C8H10	885	865±7	871			0,031		0,015
13	12,26	1,26	Acetato de isoamila	123-92-2	C7H14O2	818	876±2	876		0,008	0,843		0,678
14	12,36	1,24	Acetato de 2-metil-butila	624-41-9	C7H14O2	911	880±3	878	4,170			0,086	
15	12,96	0,92	Isobutirato de butila	97-87-0	C8H16O2	788	898±7	893	0,229				
16	12,96	1,32	Isohexanoato de metila	2412-80-8	C7H14O2	859	881±20	893	0,590			0,005	
17	12,96	1,62	2-Heptanona	110-43-0	C7H14O	865	891±2	893		0,002	0,027	0,005	0,018
18	12,96	0,59	1-Noneno	124-11-8	C9H18	902	889±3	893	0,919				
19	13,06	2,31	Estireno	100-42-5	C8H8	776	893±5	895	0,223		0,235	0,007	0,068
20	13,06	1,60	o-Xileno	95-47-6	C8H10	818	887±8	895					0,012
21	13,36	1,27	Pentanoato de etila	539-82-2	C7H14O2	756	900±2	902					0,003
22	13,46	1,40	Acetato de 3-metil-ciclopentila	24070-70-0	C8H14O2	825	905±NA	904	0,995				
23	14,06	1,05	Isobutirato de isobutila	97-85-8	C8H16O2	911	910±4	916	149,048			0,917	0,064
24	14,46	1,46	Hexanoato de metila	106-70-7	C7H14O2	890	925±3	924	3,406			0,018	
25	14,46	0,74	5,5-Dimethyl-1-vinylbicyclo[2.1.1]hexane	16626-39-4	C10H16	796	921±NA	924	0,304				
26	14,66	0,82	1,3-Nonadieno	56700-77-7	C9H16	857	924±0	928	9,139				
27	14,76	1,96	Hex-3-enoato de metila (Z)	13894-62-7	C7H12O2	859	933±NA	930	0,491				
28	15,06	0,78	α-Pineno	80-56-8	C10H16	910	937±3	936	49,225		0,041	0,002	
29	15,06	1,47	4-metil-2-heptanona	6137-06-0	C8H16O	911	943±6	936		0,085	0,165	0,017	0,114
30	15,16	1,81	Tiglato de etila	5837-78-5	C7H12O2	816	939±1	938			0,007		0,017
31	15,36	1,48	3,4-dimetil-2-hexanona	19550-10-8	C8H16O	835	943±NA	942			0,012		0,016
32	15,36	1,58	S-Methyl 3-methylbutanethioate	23747-45-7	C6H12OS	954	938±0	942	4,581			0,031	
33	15,56	1,07	2-metilbutanoato de propila	37064-20-3	C8H16O2	905	946±8	946	0,710				
34	15,96	0,80	Canfeno	79-92-5	C10H16	862	952±2	954	16,699			0,003	
35	15,86	1,11	Butanoato de isobutila	539-90-2	C8H16O2	862	955±6	952	3,006			0,010	

No.	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Composto*	CAS	Fórmula	R Match	Lit. RI ^a	Exp. RI ^b	Área cromatográfica corrigida por I.S.				
									ENIG	Mosto Au	Cont Au	Mosto AuH	Cont AuH
36	15,76	4,84	4,4-Dimetil-2-butenolida	20019-64-1	C6H8O2	900	952±5	950	0,641				
37	15,96	2,86	4-metil-2-heptanol	56298-90-9	C8H18O	854	NA	954			0,068		0,076
38	16,36	0,98	Butanoato de 1-metil-butila	60415-61-4	C9H18O2	769	970±4	962	1,118				
39	16,46	1,28	Isohexanoato de etila	25415-67-2	C8H16O2	752	969±1	964					0,002
40	16,66	1,22	Propanoato de isoamila	105-68-0	C8H16O2	806	969±3	968			0,006		
41	16,86	1,27	Propanoato de 2-metil-butila	2438-20-2	C8H16O2	903	970±4	972	39,276	0,006	0,933	0,230	
42	16,76	4,42	1-Heptanol	111-70-6	C7H16O	932	970±2	970	2,001			0,039	0,690
43	16,76	1,25	Propanoato de pentila	624-54-4	C8H16O2	831	969±17	970			0,009		0,036
44	16,86	1,47	Butil-propil-cetona	13019-20-0	C8H16O	822	976±2	972			0,006		
45	17,16	1,39	Metacrilato de n-butila	97-88-1	C8H14O2	875	989±N/A	978			0,033		0,012
46	17,26	0,92	β-Pineno	18172-67-3	C10H16	884	979±2	980	89,870			0,009	
47	17,66	1,47	4,6-dimetil-2-heptanona	19549-80-5	C9H18O	853	NA	988			0,042		0,031
48	17,66	2,25	6-metil-5-hepten-2-ona	110-93-0	C8H14O	928	986±2	988	4,702	0,015	0,033	0,094	0,057
49	17,66	1,43	5-metil-hexanoato de metila	2177-83-5	C8H16O2	836	993±N/A	988				0,024	
50	17,76	1,66	2-Octanona	111-13-7	C8H16O	842	990±7	990		0,040	0,058	0,034	0,060
51	17,86	5,39	<i>Dihydro-2-methyl-3(2H)-thiophenone</i>	13679-85-1	C5H8OS	846	996±6	992			0,023		
52	18,16	1,65	β-Mirceno	123-35-3	C10H16	893	991±2	998	5062,266		0,104	0,151	0,037
53	18,26	1,22	Hexanoato de etila	123-66-0	C8H16O2	802	1000±2	1000		0,009	1,892	0,055	1,700
54	18,46	1,62	Octanal	124-13-0	C8H16O	869	1003±2	1004	0,022		0,030		0,048
55	18,46	1,12	2-metilbutanoato de isobutila	2445-67-2	C9H18O2	921	1004±4	1004	27,154			0,072	
56	18,66	1,12	Isopentanoato de isobutila	589-59-3	C9H18O2	937	1005±2	1008	8,944			0,018	
57	18,96	1,20	Isobutirato de isoamila	2050-01-3	C9H18O2	918	1015±3	1014	97,579	0,017		0,757	0,220
58	19,16	1,11	Isobutirato de 2-metil-butila	2445-69-4	C9H18O2	932	1016±2	1018	613,283		0,016	1,520	0,014
59	19,16	2,13	2-metil-2-octanol	628-44-4	C9H20O	731	1010±23	1018			0,004		0,008
60	19,46	1,52	Heptanoato de metila	106-73-0	C8H16O2	894	1023±3	1024	11,193			0,026	
61	19,66	0,92	Carvomenteno	5502-88-5	C10H18	837	1025±4	1027	0,627				
62	19,66	1,48	p-Cimeno	99-87-6	C10H14	905	1025±4	1027	6837		0,003		
63	19,96	1,13	Limoneno	5989-27-5	C10H16	889	1030±2	1033	180,865		0,128		0,006
64	19,66	3,69	2-etil-1-hexanol	104-76-7	C8H18O	877	1030±3	1027		0,064	0,194	0,064	0,165
65	20,16	1,48	β-Ocimeno	3338-55-4	C10H16	762	1038±2	1037	0,263				
66	20,56	3,29	3,5,5-trimetil-1-hexanol	3452-97-9	C9H20O	742	1049±N/A	1045			0,007		0,010
67	20,66	0,94	Fenilacetaldéido	122-78-1	C8H8O	945	1045±4	1047		0,102		0,018	
68	20,96	1,66	4,6-dimetil-2-heptanona	19549-80-5	C9H18O	758	1045±N/A	1053		0,015	0,014	0,006	0,013
69	20,76	1,23	trans-β-Ocimeno	3779-61-1	C10H16	855	1049±2	1049	454,046			0,034	
70	21,06	1,54	<i>(E)-2-Methylbut-2-en-1-yl isobutyrate</i>	95654-17-4	C9H16O2	934	1059±N/A	1055	17,763			0,055	0,008
71	21,36	1,17	γ-Terpineno	99-85-4	C10H16	875	1060±3	1061	11,026				
72	21,36	1,36	5-metil-hexanoato de etila	10236-10-9	C9H18O2	773	1072±0	1061					0,008

No.	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Composto*	CAS	Fórmula	R Match	Lit. RI ^a	Exp. RI ^b	Área cromatográfica corrigida por I.S.				
									ENIG	Mosto Au	Cont Au	Mosto AuH	Cont AuH
73	21,46	1,67	2-metil-3-etil-2-hepteno	19780-61-1	C10H20	749	1073±NA	1063		0,006		0,001	
74	21,76	0,24	Acetofenona	98-86-2	C8H8O	897	1065±4	1069		0,472		0,005	0,564
75	21,86	4,05	1-octanol	111-87-5	C8H18O	942	1071±3	1071	1,635		0,067	0,019	0,092
76	21,96	2,41	Óxido de linalol (cis)	5989-33-3	C10H18O2	798	1074±4	1073	0,473			0,005	
77	21,96	2,55	2,6-dimetil-7-octen-2-ol	18479-58-8	C10H20O	713	1064±8	1073		0,009	0,011	0,009	0,013
78	22,46	0,90	1,10-undecadieno	13688-67-0	C11H20	790	1081±6	1082	0,570				
79	22,66	5,59	m-tolualdeído	620-23-5	C8H8O	912	1070±14	1086		0,100			
80	22,76	1,22	Terpinoleno	586-62-9	C10H16	885	1088±2	1088	7,706		0,018		
81	22,66	1,53	6-metil-heptanoato de metila	2519-37-1	C9H18O2	905	1069±1	1086	13,233			0,019	
82	22,76	3,25	2-fenilisopropanol	617-94-7	C9H12O	859	1090±7	1088			0,151		0,219
83	22,86	1,79	2-Nonanona	821-55-6	C9H18O	798	1092±2	1090			0,015		0,024
84	22,96	0,82	1-Undeceno	821-95-4	C11H22	903	1091±1	1092	1,161				
85	22,86	1,82	2-Nonanona	821-55-6	C9H18O	866	1092±2	1090	5,418			0,012	
86	23,16	1,42	Heptanoato de etila	106-30-9	C9H18O2	731	1097±3	1096	0,245		0,027		0,088
87	23,16	4,65	Benzoato de metila	93-58-3	C8H8O2	843	1094±3	1096		0,011	0,378		0,467
88	23,36	1,21	2-metil-butirato de isoamila	27625-35-0	C10H20O2	914	1101±1	1100	3,683				
89	23,26	1,92	Perilleno	539-52-6	C10H14O	913	1101±2	1098	19,068				
90	23,36	3,31	Linalol	78-70-6	C10H18O	849	1099±2	1100	58,959	0,021	0,214	0,729	0,876
91	23,36	1,67	Hop éter	344294-72-0	C10H16O	872	NA	1100	3,089			0,040	0,022
92	23,36	4,73	Isomircenol	6994-89-4	C10H16O	783	NA	1100	7,961			0,049	
93	23,56	1,67	Nonanal	124-19-6	C9H18O	805	1104±2	1104		0,021	0,073	0,026	0,111
94	23,56	1,24	2-metilbutanoato de 2-metilbutila	2445-78-5	C10H20O2	920	1105±2	1104	72,263			0,074	0,011
95	23,46	3,00	2-Nonanol	628-99-9	C9H20O	932	1102±4	1102	14,374			0,118	0,054
96	23,56	4,13	6-metil-3,5-heptadien-2-ona	1604-28-0	C8H12O	849	1107±1	1104	0,514				
97	23,56	1,53	Propanoato de hexila	2445-76-3	C9H18O2	752	1108±6	1104	5,758				
98	23,76	1,28	3-metilbutanoato de 2-metilbutila	2445-77-4	C10H20O2	923	1107±2	1108	38,016			0,041	0,005
99	23,86	2,58	Phorone	504-20-1	C9H14O	816	1092±NA	1110				0,017	0,023
100	24,26	3,55	Álcool fenílico	60-12-8	C8H10O	942	1116±5	1118			8,335		7,165
101	24,46	1,62	Octanoato de metila	111-11-5	C9H18O2	915	1126±2	1122	20,660		0,023	0,011	
102	24,46	3,41	Fenchol	1632-73-1	C10H18O	865	1113±4	1122	0,627			0,009	
103	24,76	1,49	(4E,6Z)-allo-Ocimene	7216-56-0	C10H16	872	1131±0	1128	7,774				
104	24,86	1,93	Cosmene	460-01-5	C10H14	913	1131±1	1130	6,086				
105	25,36	1,57	(4E,6E)-Allocimene	3016-19-1	C10H16	857	1144±1	1140	13,115				
106	25,46	3,73	6-metil-1-octanol	110453-78-6	C9H20O	866	1154	1142			0,058		0,129
107	25,46	4,59	Ipsdienol	35628-00-3	C10H16O	764	1147±3	1142	0,301				0,016
108	25,66	1,32	Isobutirato de hexila	2349-07-7	C10H20O2	907	1150±2	1146	41,780			0,014	0,005
109	25,86	1,54	2-methylpropionate 4-Hexen-1-ol	0-0-0	C10H18O2	883	1153±N/A	1150	5,868			0,004	
110	26,16	5,72	2-metil-6-metileno-octa-1,7-dien-3-ol	22459-10-5	C10H16O	936	1145±2	1156	6,779				0,047
111	26,16	0,82	10-metil-1-undeceno	22370-55-4	C12H24	819	1157±N/A	1156	0,197				

No.	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Composto*	CAS	Fórmula	R Match	Lit. RI ^a	Exp. RI ^b	Área cromatográfica corrigida por I.S.				
									ENIG	Mosto Au	Cont Au	Mosto AuH	Cont AuH
112	26,26	1,41	2-metiloctanoato de metila	2177-86-8	C10H20O2	839	1156±2	1158	0,493				
113	26,56	5,36	1,4-Dimetoxibenzeno	150-78-7	C8H10O2	822	1168±9	1164	0,255	0,043	0,051	0,038	0,041
114	26,76	2,05	2-octenoato de metila	2396-85-2	C9H16O2	737	1164±N/A	1168	0,504				
115	26,86	3,87	Benzoato de etila	93-89-0	C9H10O2	864	1171±2	1170			0,068		0,048
116	27,16	4,20	Borneol	507-70-0	C10H18O	822	1167±2	1176	0,879			0,011	0,013
117	27,06	5,45	Fenilacetato de metila	101-41-7	C9H10O2	886	1178±2	1174	2,056				0,007
118	27,36	1,53	4-metiloctanoato de metila	15870-07-2	C10H20O2	740	1187±NA	1180	0,237			0,017	
119	27,36	3,16	Mentol	89-78-1	C10H20O	830	1174±4	1180		0,018	0,024		0,021
120	27,46	2,80	Terpinen-4-ol	20126-76-5	C10H18O	791	1182±0	1182	0,958			0,013	
121	27,76	3,35	Ácido octanóico	124-07-2	C8H16O2	880	1180±7	1188			0,407		0,295
122	27,76	4,65	Naftaleno	91-20-3	C10H8	799	1182±8	1188		0,043	0,232	0,045	
123	27,96	0,91	(2E)-2-Dodecene	7206-13-5	C12H24	843	1197±0	1192	0,695				
124	27,86	1,62	6-metiloctanoato de metila	5129-62-4	C10H20O2	848	1193±5	1190	1,836				
125	27,86	1,87	2-decanona	693-54-9	C10H20O	878	1193±2	1190	5,423			0,003	
126	28,06	1,39	Octanoato de etila	106-32-1	C10H20O2	764	1196±3	1194		0,012	3,676	0,073	4,034
127	28,16	1,46	3,4,4-trimetil-2-ciclohexen-1-ona	17299-41-1	C9H14O	735	1198±NA	1196	1,048				
128	28,16	3,75	α-Terpineol	98-55-5	C10H18O	865	1189±2	1196	1,585	0,014	0,045	0,029	0,085
129	28,36	2,80	2-Decanol	1120-06-5	C10H22O	931	1200±7	1200	16,957			0,037	0,030
130	28,46	1,47	Propanoato de heptila	2216-81-1	C10H20O2	943	1201±NA	1202	3,113				
131	28,66	1,70	Decanal	112-31-2	C10H20O	882	1206±2	1206		0,035		0,023	0,092
132	28,76	0,87	2,3,5,8-tetrametil-decano	192823-15-7	C14H30	756	1210±3	1209	0,288				
133	29,36	1,68	Nonanoato de metila	1731-84-6	C10H20O2	865	1225±2	1221	14,409				
134	29,56	4,91	Nerol	123-35-3	C10H18O	799	1228±2	1226					0,062
135	29,56	4,25	α-Citronelol	6812-78-8	C10H20O	796	1212±1	1226			0,038		0,165
136	29,96	1,34	2-metilbutanoato de hexila	10032-15-2	C11H22O2	910	1236±3	1234	3,724				
137	30,36	4,30	Fenilacetato de etila	101-97-3	C10H12O2	838	1246±3	1243			0,009		
138	30,46	1,39	Isobutirato de heptila	2349-13-5	C11H22O2	923	1247±1	1245	28,571				
139	30,66	1,12	1,3-Di-tert-butilbenzeno	1014-60-4	C14H22	815	1249±NA	1249		0,014	0,010	0,008	0,021
140	30,66	5,37	Geraniol	106-24-1	C10H18O	759	1255±3	1249	21,243		0,063	0,110	0,132
141	30,76	1,41	Hexanoato de 2-metilbutila	2601-13-0	C11H22O2	915	1247±1	1251	8,821			0,001	
142	30,86	4,57	Acetato de fenetila	103-45-7	C10H12O2	875	1258±3	1253			0,207		0,108
143	31,76	3,42	1-Decanol	112-30-1	C10H22O	904	1273±2	1272	2,191	10,171	20,511	7,631	15,571
144	31,86	2,24	(Z)-Undec-6-en-2-ona	107853-70-3	C11H20O	895	1274±NA	1274	22,612			0,025	
145	32,66	2,02	2-Undecanona	112-12-9	C11H22O	898	1294±2	1291	105,591			0,029	0,010
146	32,66	1,11	1-Trideceno	2437-56-1	C13H26	880	1292±1	1291	1,527				
147	32,76	1,53	Nonanoato de etila	123-29-5	C11H22O2	731	1296±2	1294	0,009				0,010
148	32,86	3,35	2-metilpropanoato de benzila	103-28-6	C11H14O2	862	1305±1	1296	0,372				
149	33,06	1,60	Propanoato de octila	142-60-9	C11H22O2	929	1302±NA	1300	3,031				
150	33,06	2,75	2-Undecanol	1653-30-1	C11H24O	933	1307±4	1300	33,659			0,043	0,022

No.	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Composto*	CAS	Fórmula	R Match	Lit. RI ^a	Exp. RI ^b	Área cromatográfica corrigida por I.S.				
									ENIG	Mosto Au	Cont Au	Mosto AuH	Cont AuH
151	33,56	1,48	2-furoato de isoamila	615-12-3	C10H14O3	714	1318±NA	1311	0,824				
152	33,96	2,41	Geranato de metila	1189-09-9	C11H18O2	906	1324±2	1320	125,95			0,062	0,011
153	34,06	1,72	Decanoato de metila	110-42-9	C11H22O2	893	1325±1	1323	7,895				
154	34,56	1,41	2-metilbutanoato de heptila	50862-12-9	C12H24O2	874	1333±2	1334	1,277				
155	34,96	1,51	Isobutirato de octila	109-15-9	C12H24O2	899	1346±3	1343	25,063				
156	35,26	1,50	Heptanoato de isoamila	109-25-1	C12H24O2	876	1334±1	1350	15,038				
157	35,36	1,23	α-Cubeneno	17699-14-8	C15H24	763	1351±2	1352	1,163				
158	36,26	3,31	1-Undecanol	112-42-5	C11H24O	851	1371±3	1373		0,265	0,386	0,175	0,372
159	36,36	0,91	Farnesano	3891-98-3	C15H32	756	1366±2	1375			0,013		0,017
160	36,36	1,29	Ylangene	14912-44-8	C15H24	897	1372±2	1375	54,467				
161	36,46	2,35	Acetato de Nerila	141-12-8	C12H20O2	744	1364±3	1377	2,183				
162	36,66	1,35	Copaeno	3856-25-5	C15H24	878	1376±2	1382	164,266				
163	36,66	2,73	β-Damascenona	23726-93-4	C13H18O	763	1386±5	1382		0,003	0,033	0,002	0,039
164	36,86	1,57	Hexanoato de hexila	6378-65-0	C12H24O2	764	1384±2	1386	0,585				
165	36,86	1,87	9-decenoato de etila	67233-91-4	C12H22O2	846	1387±2	1386			0,853		0,755
166	37,16	1,63	Decanoato de etila	110-38-3	C12H24O2	874	1396±2	1393					0,114
167	37,16	2,02	2-Dodecanona	6175-49-1	C12H24O	877	1396±9	1393	9,411				
168	37,16	3,29	Isobutirato de feniletila	103-48-0	C12H16O2	855	1396±0	1393	0,429				
169	37,16	1,51	(-)-β-Elemeneno	515-13-9	C15H24	863	1391±2	1393	4,210				
170	37,36	1,33	(+)-Sativeno	3650-28-0	C15H24	834	1396±0	1398	3,440				
171	37,86	1,81	Dodecanal	112-54-9	C12H24O	860	1409±4	1410		0,026	0,061	0,013	0,048
172	38,26	1,41	cis-α-Bergamotene	18252-46-5	C15H24	864	1415±3	1419	11,889				
173	38,56	2,88	2-metil-1-undecanol	10522-26-6	C12H26O	839	1422±NA	1426		0,322	0,617	0,129	0,540
174	38,66	1,72	Cariofileno	87-44-5	C15H24	884	1419±3	1429	1663,885				
175	39,06	1,47	trans-α-Bergamotene	17699-05-7	C15H24	883	1435±4	1438	219,207			0,004	0,028
176	39,36	1,59	Octanoato de isoamila	2035-99-6	C13H26O2	766	1446±4	1445					0,006
177	39,46	2,46	Nerilacetona	3879-26-3	C13H22O	720	1435±3	1448		0,003	0,013		0,009
178	39,56	2,10	Propionato de nerila	105-91-9	C13H22O2	734	1455±25	1450	1,745				
179	39,96	2,29	(E)-β-Fameseno	18794-84-8	C15H24	890	1457±2	1460	492,074				
180	40,46	1,69	Humuleno	6753-98-6	C15H24	862	1454±3	1471	2959,188		0,018	0,018	0,009
181	40,66	3,18	1-Dodecanol	112-53-8	C12H26O	900	1473±4	1476	2,985	8,406	19,006	5,202	13,956
182	40,86	1,71	2-Isopropenyl-4a,8-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalene	103827-22-1	C15H24	862	1492±NA	1481	406,837				
183	41,26	1,65	(Z,E)-α-Farneseno	26560-14-5	C15H24	842	1491±3	1490	28,321				
184	41,56	1,78	Eremofileno	10219-75-7	C15H24	880	1499±8	1498	461,231				
185	41,66	1,59	α-Selineno	473-13-2	C15H24	776	1494±3	1500	694,645				0,004
186	41,96	1,55	δ-Guaieno	3691-11-0	C15H24	781	1505±3	1508	1316,307				
187	41,96	2,31	2,4-Di-tert-butilfenol	96-76-4	C14H22O	800	1519±6	1508			0,040		0,061
188	42,06	1,98	Tridecanal	10486-19-8	C13H26O	816	1512±5	1510			0,029		0,008

No.	¹ t _R (min)	² t _R (s)	Composto*	CAS	Fórmula	R Match	Lit. RI ^a	Exp. RI ^b	ENIG	Área cromatográfica corrigida por I.S.			
										Mosto Au	Cont Au	Mosto AuH	Cont AuH
189	42,46	1,86	γ-Cadinene	39029-41-9	C15H24	873	1513±2	1520	342,294				
190	42,76	2,19	Calameneno	483-77-2	C15H22	861	1523±5	1527	14,985				
191	42,86	1,80	(-)-Zonareno	41929-05-9	C15H24	835	1527±NA	1530	15,728				
192	43,16	1,90	4-Isopropyl-1,6-dimethyl- 1,2,3,4,4a,7- hexahydronaphthalene	16728-99-7	C15H24	861	1533±4	1537	19,438				
193	43,36	1,87	α-Cadinene	24406-05-1	C15H24	857	1538±1	1542	28,274				
194	43,56	2,40	α-Calacoreno	21391-99-1	C15H20	851	1542±3	1548	6,755				
195	44,46	2,35	(Z)-Tetradec-6-en-2-ona	0-0-0	C14H26O	863	1570±NA	1570	3,315				
196	44,66	3,13	n-Tridecan-1-ol	112-70-9	C13H28O	857	1577±5	1575	2,686	2,353	10,212	1,497	5,730
197	44,86	1,79	Octanoato de hexila	1117-55-1	C14H28O2	761	1581±2	1580	0,354				
198	45,26	2,59	Óxido de cariofileno	1139-30-6	C15H24O	809	1581±2	1590	2,225			0,031	
199	45,36	1,76	Dodecanoato de etila	106-33-2	C14H28O2	723	1595±2	1593			0,015		0,005
200	45,86	2,68	Epóxido de humuleno I	19888-33-6	C15H24O	762	1604±3	1606	0,945			0,011	0,014
201	46,26	2,80	Epóxido de humuleno II	19888-34-7	C15H24O	789	1606±2	1617	5,164			0,028	
202	46,56	3,30	Selin-6-en-4α-ol	118173-08-3	C15H26O	832	1636±NA	1625	3,367			0,006	
203	46,86	2,76	1,10-Di-epi-Cubenol	73365-77-2	C15H26O	758	1614±3	1633	1,211				
204	47,36	3,35	α-epi-Cadinol	5937-11-1	C15H26O	819	1640±2	1647	1,912				
205	47,96	1,48	Éter de octila	629-82-3	C16H34O	882	1659±2	1664			0,117		0,025
206	47,96	1,65	Diidro-aplotaxeno	56134-03-3	C17H30	869	1665±NA	1664	3,621				
207	48,26	2,36	(Z)-Pentadec-6-en-2-ona	252931-22-9	C15H28O	906	1670±NA	1672	3,067				
208	48,26	1,54	cis-9-Tetradecen-1-ol	35153-15-2	C14H28O	844	1667±NA	1672	0,477				
209	49,16	1,92	2-Pentadecanona	2345-28-0	C15H30O	778	1698±4	1697	0,327				

*Compostos tentativamente identificados e com alguns nomes deixados em inglês (itálico) evitando-se tradução incorreta

Abreviações: ENIG: lúpulo enigma; I.S.: Padrão interno 2-octanol; Au: Australian Pale ale; AuH: Australian Pale ale com adição de lúpulo Enigma; NA: Não disponível.

^a Lit. RI, índices de retenção da literatura para os compostos em uma coluna não polar “*semi-standard*”, 5% de fenil usando a biblioteca NIST 11;

^b Exp. RI, índice de retenção experimental calculado pela equação de Van den Dol e Kratz;

Figura A.14: Gráfico de número de componentes principais por variância capturada para o modelo de MPCA para testes exploratórios da influência de adição de micronutrientes de Cr e Se em cervejas Au, AuH, IPA e St.

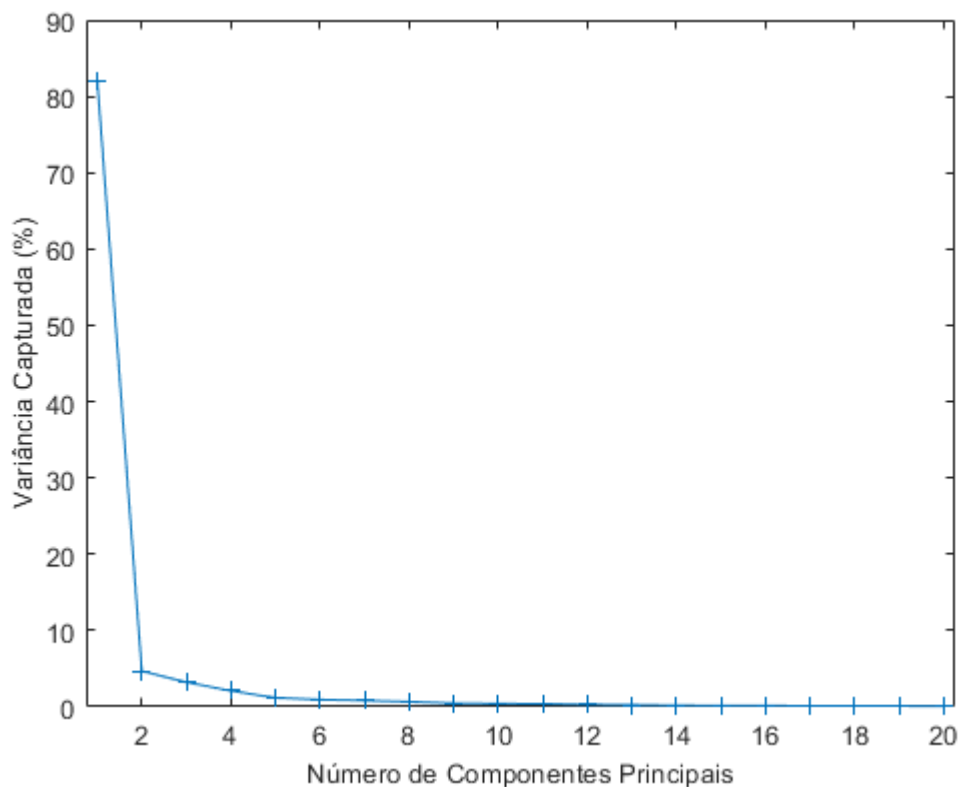
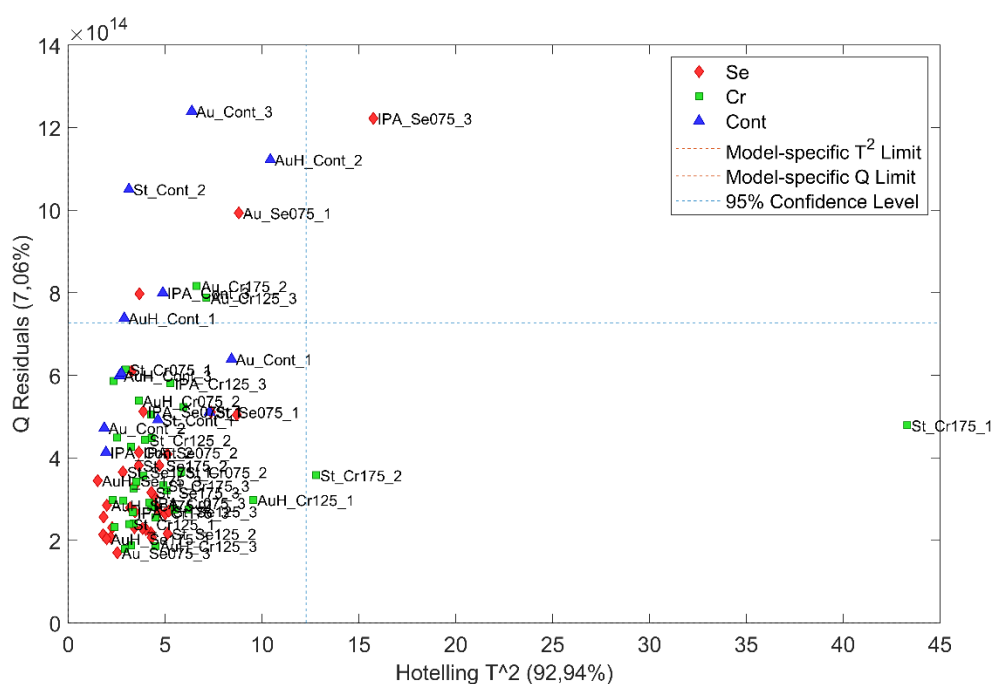


Figura A.15: Gráfico da primeira rodada de remoção de *outliers* para o modelo de MPCA para testes exploratórios da influência de adição de micronutrientes de Cr e Se em cervejas Au, AuH, IPA e St.



Scatter plot showing Q Residuals (6,83%) versus Hotelling T^2 (93,17%). The y-axis is scaled by $\times 10^{14}$. The plot includes data points for Se (red diamonds), Cr (green squares), and Cont (blue triangles). Two horizontal dashed lines indicate the Model-specific T^2 Limit (orange) and Model-specific Q Limit (blue). A vertical dashed line indicates the 95% Confidence Level (blue).

[illegible]

Figura A.18: Gráfico de escores em MPCA entre PC4 e número de amostras para amostras de cerveja dos tipos Stout (St), Canadian Indian Pale Ale (IPA), Australian Pale Ale (Au) e Australian Pale Ale com uso do lúpulo Enigma (AuH) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.

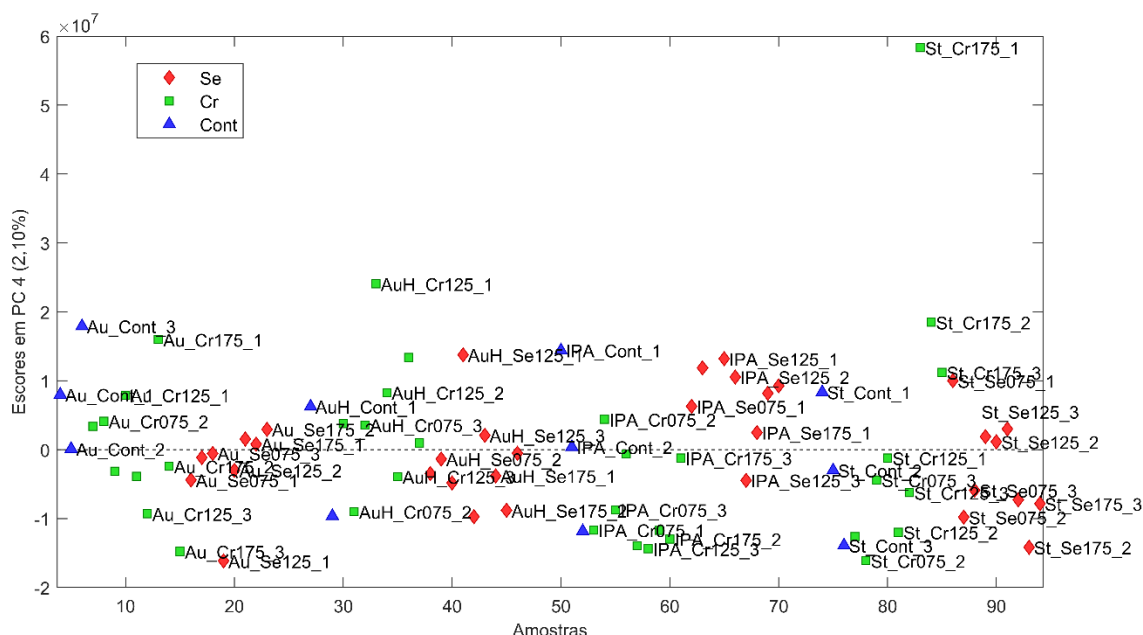


Figura A.19: Gráfico de escores em MPCA entre PC5 e número de amostras para amostras de cerveja dos tipos Stout (St), Canadian Indian Pale Ale (IPA), Australian Pale Ale (Au) e Australian Pale Ale com uso do lúpulo Enigma (AuH) contando com a adição de micronutrientes comerciais de Cr e Se em níveis 0% (cont), 7,5%, 12,5% e 17,5% de IDR.

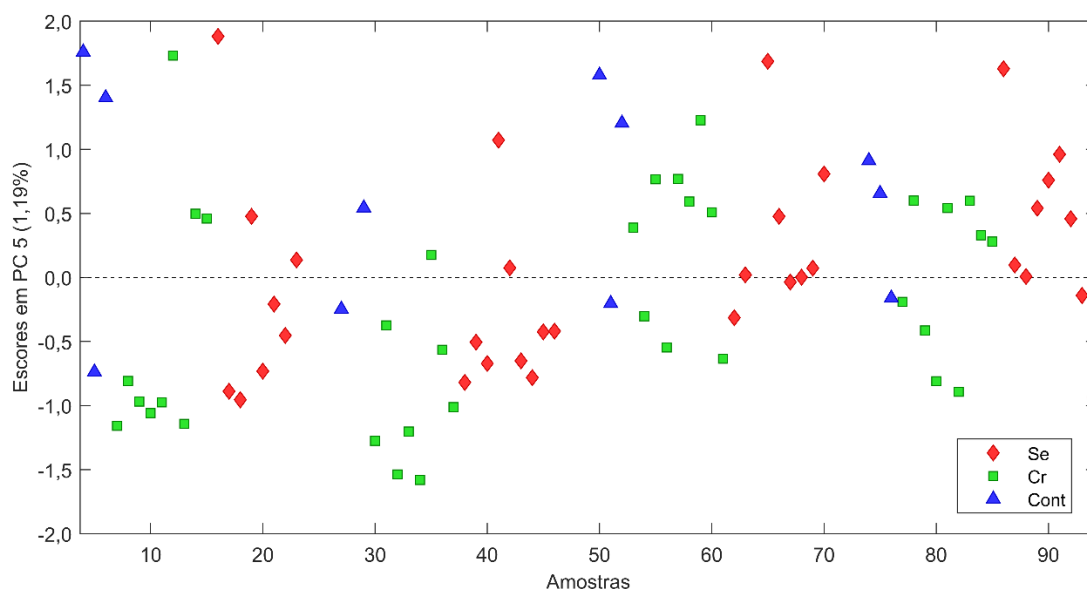
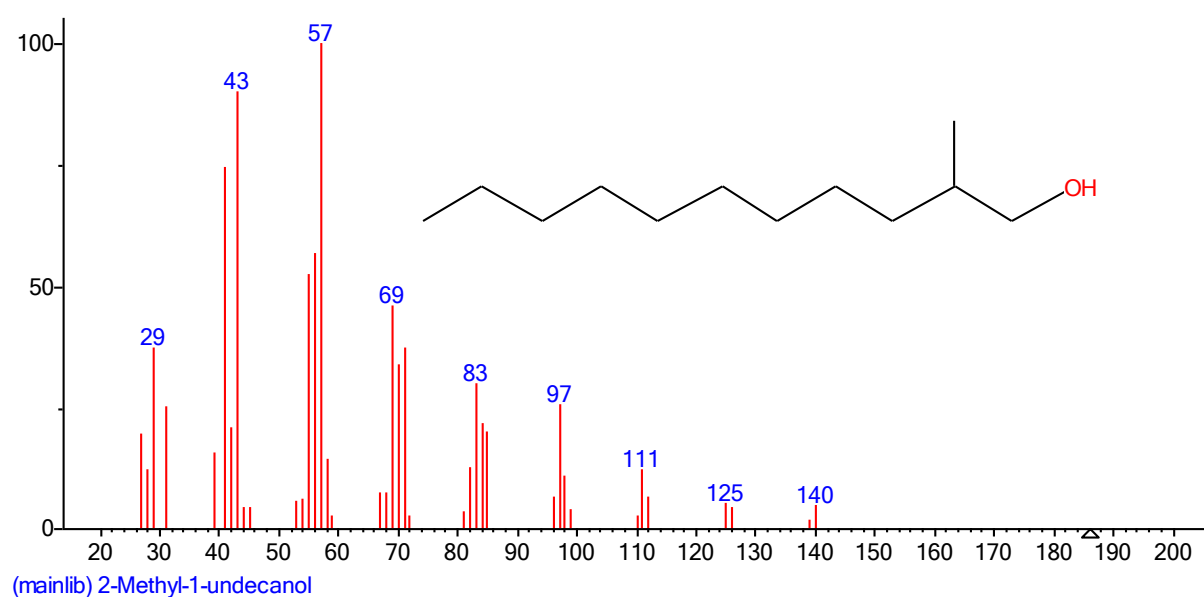
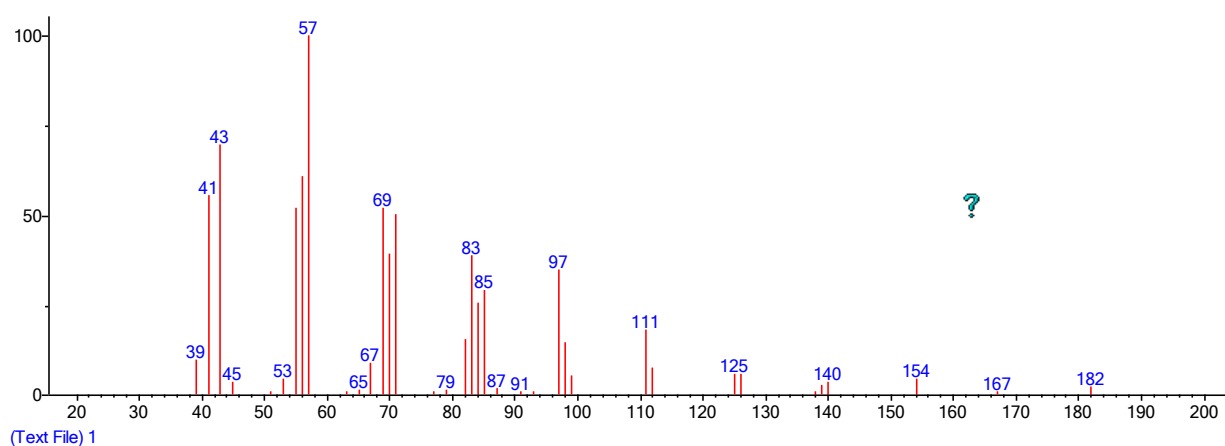


Figura A.20: Espectro de massas para o pico presente em ^1t_R 43,18 min e ^2t_R 3,23 s, com relevância descrita pela matriz de pesos em PC3 em modelo de MPCA com todas as cervejas estudadas e de 2-metil-1-undecanol.



Apêndice D – Informações complementares do Capítulo 5

Tabela A.22: Informações dos lúpulos

	Azacca (AZAC)	Cascade (CASC)	Enigma™ (ENIG)	Loral™ (LORA)	Zappa (ZAPP)
<i>Classe</i>	Propósito duplo	Aroma	Propósito duplo	Propósito duplo	Aroma
<i>Sinônimo</i>	Azaaca	-	-	HBC291	-
<i>Propósito</i>	Aroma e amargor	Aroma	Aroma e amargor	Aroma e amargor	Aroma
<i>Sucessão</i>	Toyomidori e ADHA 94/95	Cruzamento de fuggle inglês com descendente masculino da variedade russa Serebrianka	Descendente do lúpulo suíço Tettnang e do lúpulo norte-americano	Filha do US Glacier e do US Nugget	Desconhecida

Tabela A.23: Precisão intradiária e interdiária de picos selecionados por HS-SPME-GC×GC – MS em lúpulo.

No.	Composto	Intra-day R.S.D (%) (n=5)			Inter-day R.S.D (%) (n=9)		
		¹ t _R	² t _R	Area%	¹ t _R	² t _R	Area%
1	Isobutirato de isobutila	0,00	0,05	9,63	0,54	1,21	12,81
2	β-Mirceno	0,00	0,16	3,00	0,58	3,17	10,39
3	2-metilbutoanato de isobutila	0,00	0,49	6,73	0,54	4,39	14,13
4	D-Limoneno	0,23	4,30	3,12	0,50	5,45	4,43
5	Perilleno	0,00	0,47	5,86	0,44	8,67	8,02
6	Linalool	0,00	0,30	5,89	0,44	7,71	6,58
7	2-Undecanona	0,00	0,28	1,56	0,31	5,48	5,61
8	trans-Geraniato de metila	0,00	0,24	1,85	0,30	8,02	7,11
9	Copaeno	0,00	0,27	3,69	0,28	3,89	3,87
10	Cariofileno	0,00	0,69	1,55	0,26	5,97	2,27
11	α-Bergamoteno	0,00	0,39	1,87	0,26	3,54	1,65
12	(E)-β-Farneseno	0,00	0,27	4,88	0,25	5,48	4,16
13	γ-Muroleno	0,00	0,60	1,78	0,25	5,63	2,24
14	α-Curcumeno	0,00	0,25	2,66	0,25	6,68	3,06
15	β-Eudesmene	0,00	0,26	5,27	0,24	7,00	6,32
16	α-Selineno	0,00	0,18	3,18	0,24	5,97	4,58
17	Isobutirato de geranila	0,00	0,33	1,51	0,22	4,41	2,79
18	β-Bisaboleno	0,00	0,22	4,57	0,24	4,80	4,19
19	Calameneno	0,00	0,26	2,53	0,24	6,68	2,76
20	Zonareno	0,00	0,24	8,56	0,24	5,08	8,04
21	α-Cadineno	0,00	0,45	2,13	0,23	6,14	1,87
22	Epóxido de humuleno I	0,00	0,29	7,85	0,22	8,77	10,15

Figura A.21: Comparação entre duas configurações de coluna para GC×GC aplicando HS-SPME para o lúpulo do tipo Cascade, onde para a coluna ¹D é uma DB-5ms UI (30 m × 0,25 mm I.D. × 0,25 µm d_f) e as colunas ²D: (A) BPX50(1,0 m × 0,10 mm I.D. × 0,10 µm d_f) e (B) SUPELCOWAX10 (1,0 m × 0,10 mm I.D. × 0,10 µm d_f)

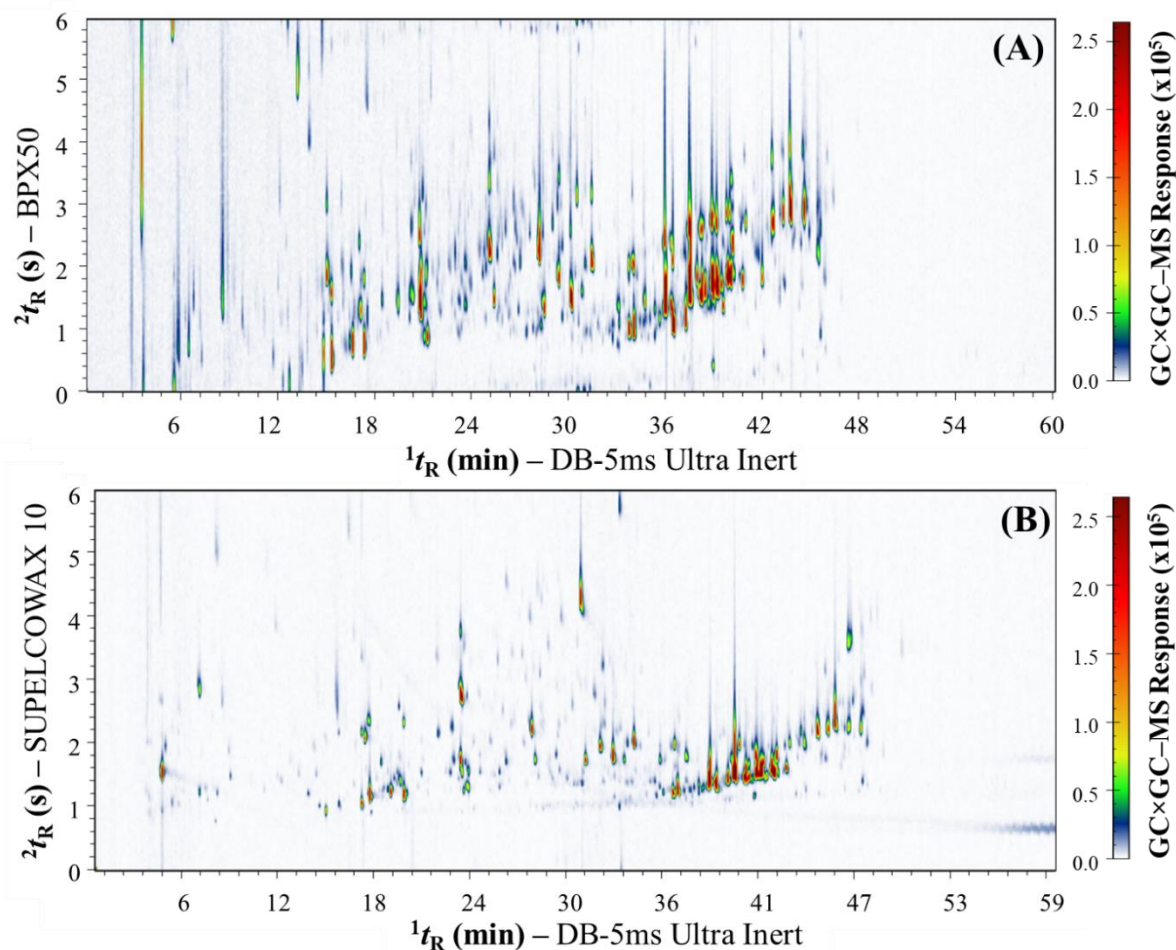


Tabela A.24: Série de n-alcenos C8-C21 e seus respectivos tempos de retenção na primeira dimensão (¹t_R – DB-5msUI) e segunda dimensão (²t_R – SUPELCOWAX 10).

Alcano	¹ t _R (min)	² t _R (s)	CAS	Fórmula
C8	8,86	0,36	111-65-9	C8H18
C9	13,06	0,40	111-84-2	C9H20
C10	17,96	0,52	124-18-5	C10H22
C11	23,06	0,57	1120-21-4	C11H24
C12	28,06	0,64	112-40-3	C12H26
C13	32,76	0,74	629-50-5	C13H28
C14	37,26	0,87	629-59-4	C14H30
C15	41,46	0,88	629-62-9	C15H32
C16	45,46	1,03	544-76-3	C16H34
C17	49,16	1,12	629-78-7	C17H36
C18	52,76	1,23	593-45-3	C18H38
C19	55,66	1,01	629-92-5	C19H40
C20	57,66	0,95	112-95-8	C20H42
C21	59,56	1,02	629-94-7	C21H44

Figura A. 22: Definição do período de modulação para a separação dos compostos presentes em lúpulo Cascade por HS-SPME-GC×GC-MS com colunas na ¹D: DB-5MS UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e ²D: BPX50(1,0 m x 0,15 mm x 0,15 µm) para os tempos de 4, 5, 6 e 7 s.

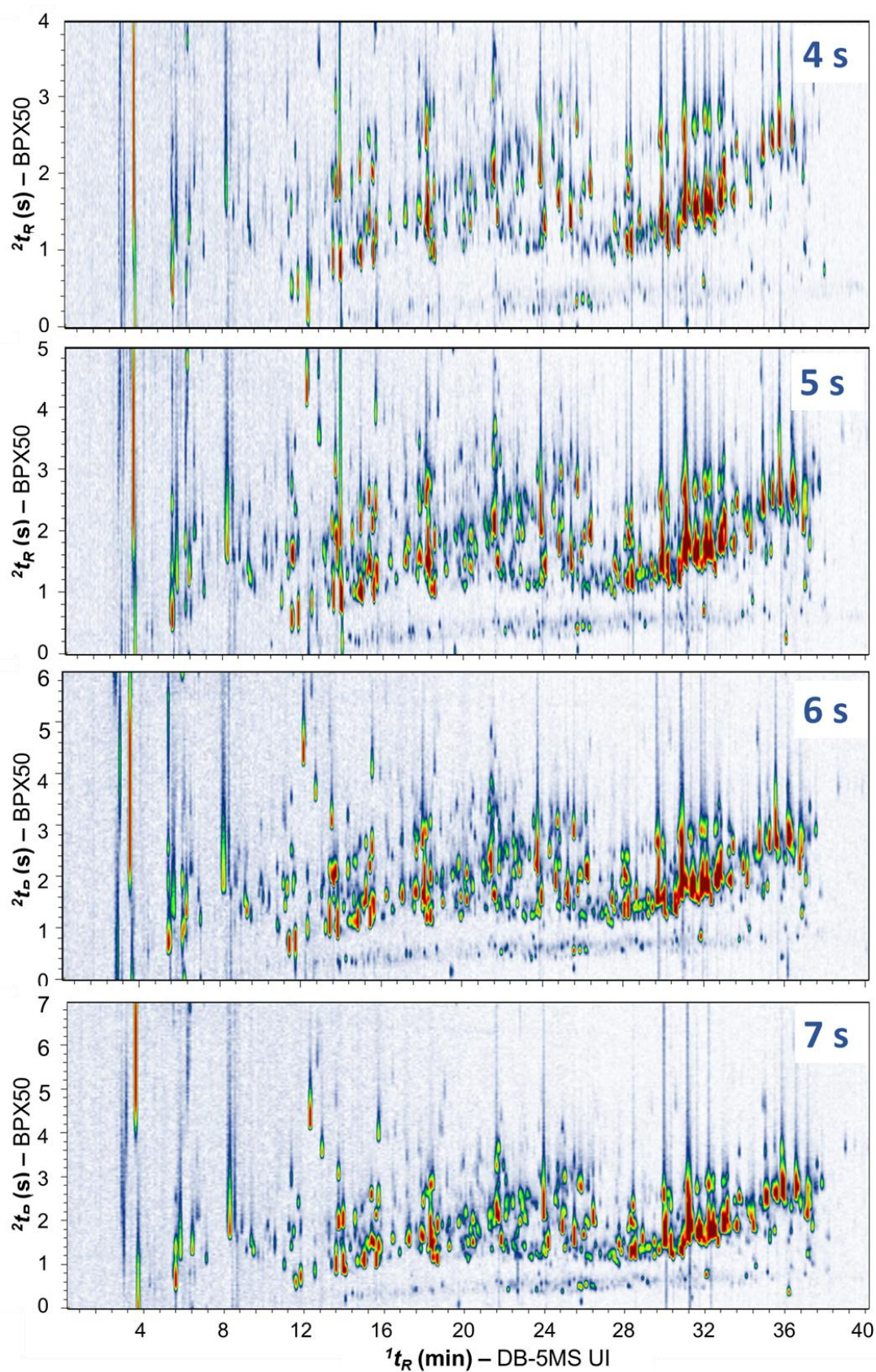


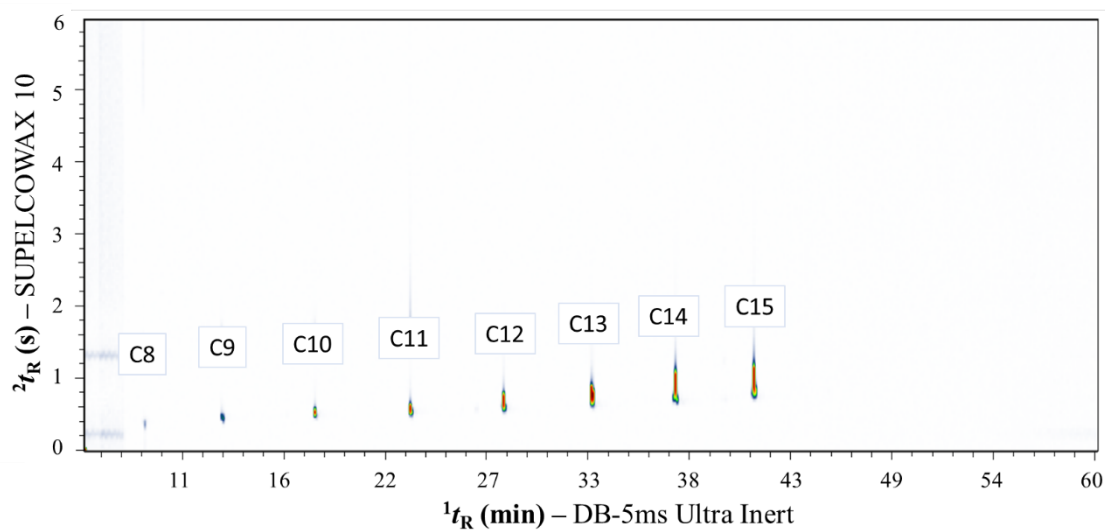
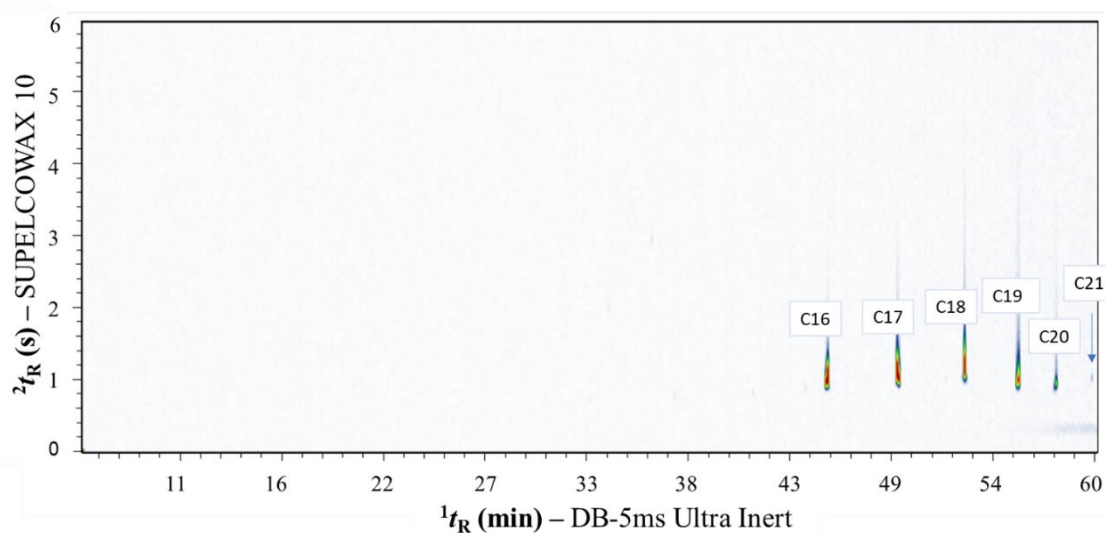
Figura A.23: Cromatograma de GC×GC–MS por HS–SPME para a série de alcanos (C8-C15)**Figura A.24:** Cromatograma de GC×GC–MS por HS–SPME para a série de alcanos (C16-C21)

Figura A.25: Comparação entre dois cromatogramas de GC–MS (A) e GC×GC–MS (B) aplicando HS-SPME em lúpulo Enigma, onde o GC–MS e a ¹D coluna de GC×GC–MS foram configuradas com coluna DB-5ms UI (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm *d_f*) e a ²D coluna uma SUPELCOWAX 10 (1,0 m × 0,10 mm D.I. × 0,10 µm *d_f*), e a estrutura dos compostos selecionados (C) representada por a-g expressos em (A) e (B).

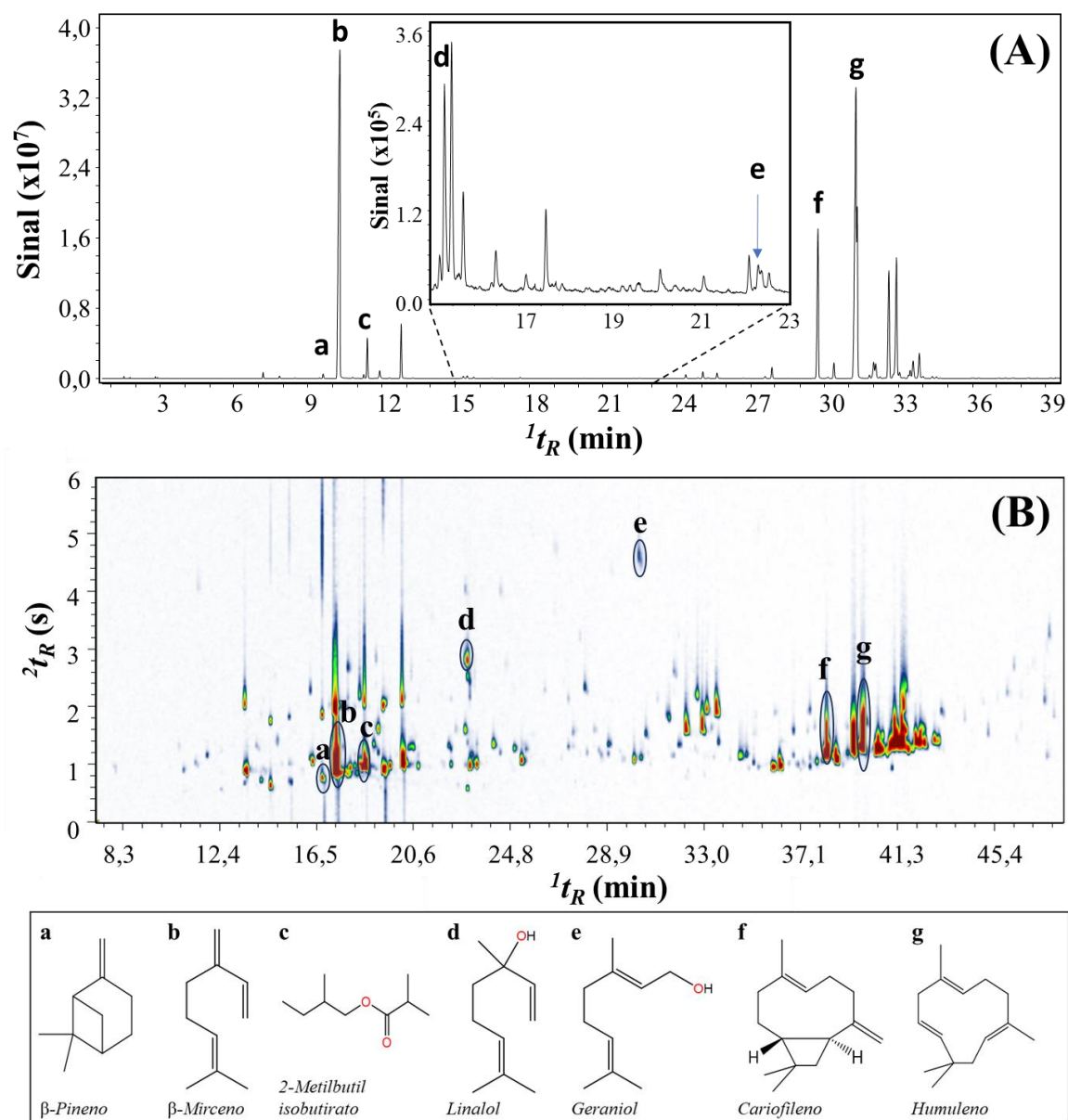


Figura A.26: Comparação entre dois cromatogramas de GC-MS (A) e GC×GC-MS (B) aplicando HS-SPME em lúpulo Zappa, onde o GC-MS e a ¹D coluna de GC×GC-MS foram configuradas com coluna DB-5ms UI (30 m × 0,25 mm D.I. × 0,25 µm *d_f*) e a ²D coluna uma SUPELCOWAX 10 (1,0 m × 0,10 mm D.I. × 0,10 µm *d_f*), e a estrutura dos compostos selecionados (C) representada por a-g expressos em (A) e (B).

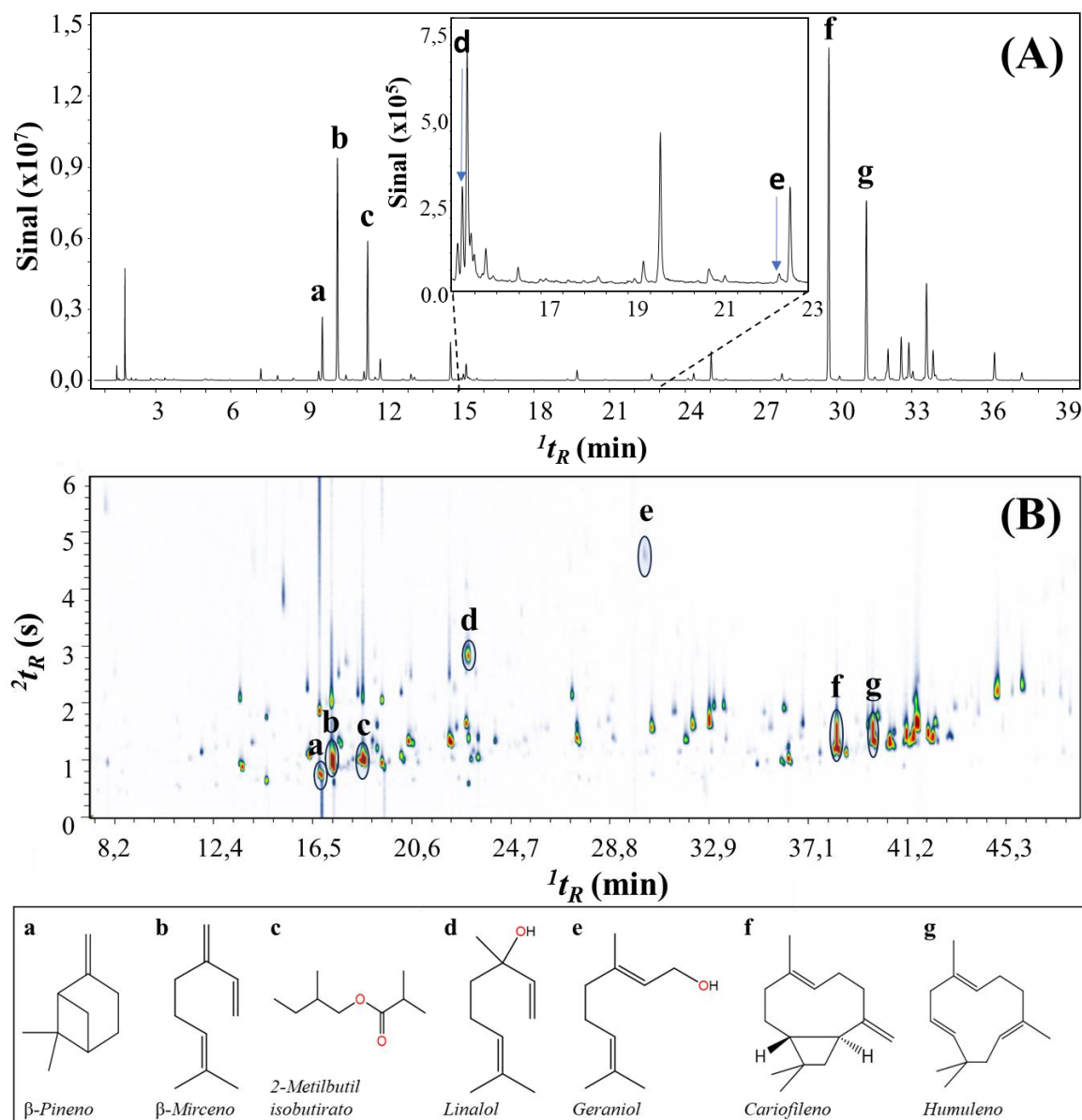


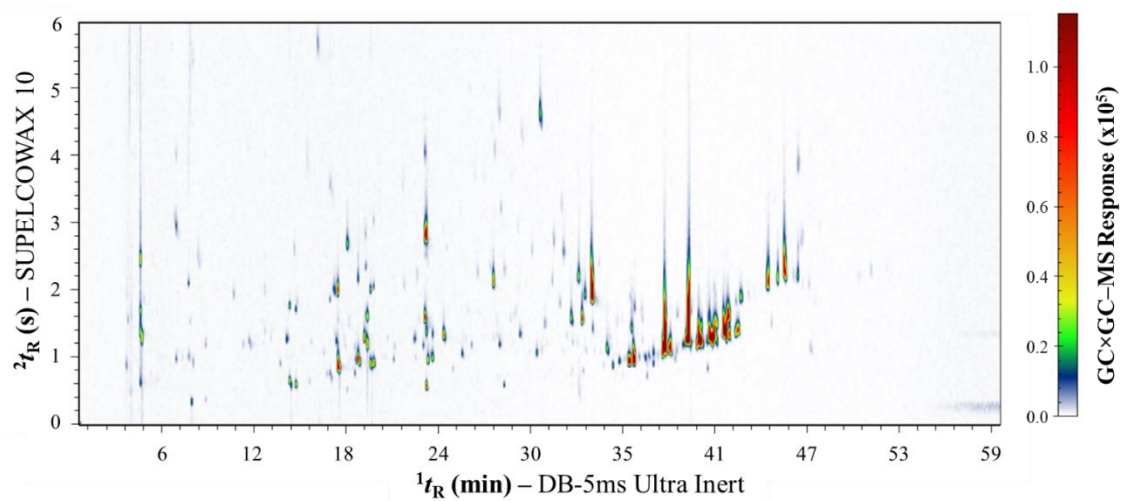
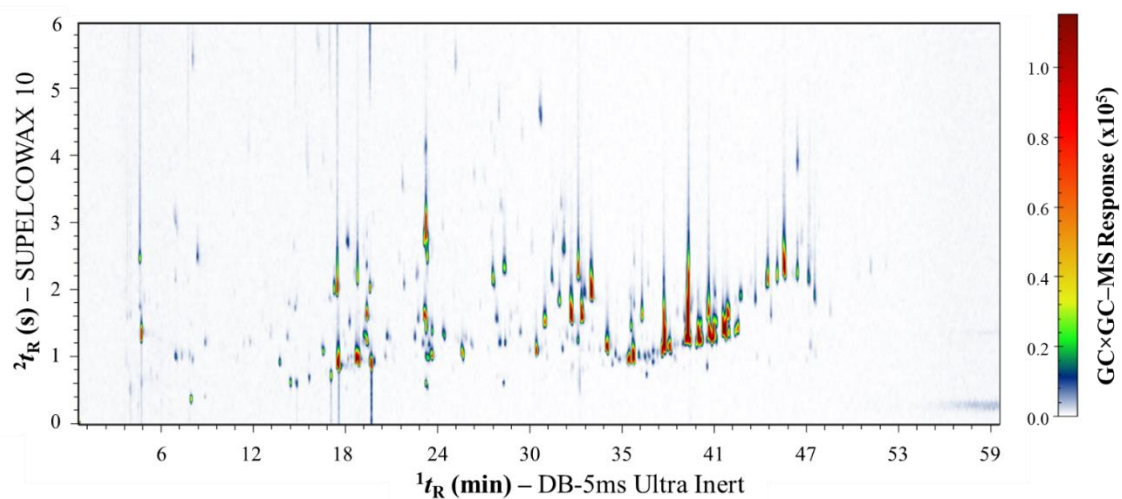
Figura A.27: GC×GC-MS cromatograma por HS-SPME do lúpulo Azacca (AZAC)**Figura A.28:** GC×GC-MS cromatograma por HS-SPME do lúpulo Loral (LORA)

Tabela A.25: Informação sobre a composição de lúpulos por HS-SPME-GC-MS

No.	t _R (min)	Composto*	CAS	Fórmula	Lit. RI ^a	Exp. RI ^b	Área cromatográfica relativa (%) (Valores médios ± SD para n=3)								
							CASC		ENIG		ZAPP				
1	5,2	Isobutirato de propila	644-49-5	C7H14O2	842±6	851	ND		0,0033	±	0,0006	0,1461	±	0,0062	
2	6,0	Acetato de 2-metilbutila	624-41-9	C7H14O2	880±3	876	ND		0,0046	±	0,0009	0,0498	±	0,0053	
3	7,1	Isobutirato de isobutila	97-85-8	C8H16O2	910±4	913	0,0214	±	0,0018		ND	0,5585	±	0,0317	
4	7,8	α-Tujeno	2867-05-2	C10H16	929±2	929	0,2195	±	0,0085		ND	0,2758	±	0,0170	
5	7,8	α-Pineno	80-56-8	C10H16	937±3	930	0,2727	±	0,0149	0,1174	±	0,0222		ND	
6	8,4	5,5-Dimetil-2(5H)-furanona	20019-64-1	C6H8O2	952±5	944	0,1859	±	0,0015		ND	0,1892	±	0,0138	
7	8,5	Canfeno	79-92-5	C10H16	952±2	945	ND		0,0339	±	0,0069			ND	
8	9,5	Propionato de 2-metilbutila	2438-20-2	C8H16O2	970±4	970	ND		0,0427	±	0,0100	0,5077	±	0,0256	
9	9,6	β-Pineno	127-91-4	C10H16	979±2	974	0,4879	±	0,0344	0,2303	±	0,0290	3,4566	±	0,2572
10	10,1	6-Metil-5-hepteno-2-ona	110-93-0	C8H14O	986±2	985	0,2180	±	0,0152		ND			ND	
11	10,3	β-Mirceno	123-35-3	C10H16	991±2	991	4,2778	±	0,3663	29,5075	±	2,5200	13,1833	±	1,3945
12	10,8	2-metilbutoanato de isobutila	2445-67-2	C9H18O2	1004±4	1003	ND		0,0603	±	0,0059	0,4956	±	0,0592	
13	11,3	Isobutanoato de isoamila	2050-01-3	C9H18O2	1015±3	1012	ND		0,1858	±	0,0172			ND	
14	11,4	Isobutirato de 2-metilbutila	2445-69-4	C9H18O2	1016±2	1016	0,4811	±	0,0333	2,0756	±	0,1742	7,9836	±	0,6122
15	11,7	p-Cimeno	99-87-6	C10H14O	1025±2	1022	0,4564	±	0,0451	0,0112	±	0,0049	0,2097	±	0,0302
16	11,9	D-Limoneno	5989-27-5	C10H16	1030±2	1026	1,5083	±	0,1623	0,5335	±	0,0425	1,3000	±	0,1141
17	12,3	β-Ocimeno	13877-91-3	C10H16	1037±7	1035	ND		0,0404	±	0,0058			ND	
18	12,8	trans-β-Ocimeno	3779-61-1	C10H16	1049±2	1045	ND		2,8898	±	0,2404	0,0819	±	0,0039	
19	13,1	Isobutirato de prenila	76649-23-5	C9H16O2	1052±1	1052	ND				ND	0,3941	±	0,0150	
20	13,3	γ-Terpineno	99-85-4	C10H16	1060±3	1057	0,0208	±	0,0040		ND			ND	
21	13,9	Óxido de linalol (cis)	5989-33-3	C10H18O2	1074±4	1069	0,0507	±	0,0077		ND	0,0257	±	0,0026	
22	14,7	6-Metilheptanoato de metila	2519-37-1	C9H18O2	NA	1086	ND				ND	2,1707	±	0,0722	
23	15,0	2-Nonanona	821-55-6	C9H18O	1092±2	1092	0,0293	±	0,0037		ND			ND	
24	15,1	Éter de lúpulo	344294-72-0	C10H16O	NA	1095	0,1956	±	0,0419	0,0021	±	0,0007	0,1472	±	0,0358
25	15,2	Perilleno	539-52-6	C10H14O	1101±2	1097	1,1136	±	0,1940	0,0174	±	0,0064	0,3953	±	0,0452
26	15,3	Linalol	78-70-6	C10H18O	1099±2	1099	1,2597	±	0,2218	0,1266	±	0,0350	1,0377	±	0,0886

No.	t _R (min)	Composto*	CAS	Fórmula	Lit. RI ^a	Exp. RI ^b	Área cromatográfica relativa (%) (Valores médios ± SD para n=3)						
							CASC			ENIG		ZAPP	
27	15,5	2-metilbutoanato de 2-metilbutila	2445-78-5	C10H20O2	1105±2	1103	ND			0,1464	±	0,0235	0,1099 ± 0,0132
28	15,7	Isovalerato de 2-metilbutila	2445-77-4	C10H20O3	1107±2	1108	0,1321	±	0,0258	0,0471	±	0,0084	0,1106 ± 0,0082
29	16,5	Octanoato de metila	111-11-5	C9H18O2	1126±2	1124	ND			0,0215	±	0,0163	0,0677 ± 0,0061
30	17,2	(4E,6E)-Allocimeno	3016-19-1	C10H16	1144±1	1138	ND			0,0106	±	0,0022	ND
31	17,6	Isobutirato de hexila	2349-07-7	C10H20O2	1150±2	1148	ND			0,0448	±	0,0123	ND
32	19,7	<i>Methyl 6-methyloctanoate</i>	5129-62-4	C10H20O2	1193±5	1192	ND			ND			0,7060 ± 0,0632
33	21,2	Nonanoato de metila	1731-84-6	C10H20O2	1225±2	1223	ND			0,0108	±	0,0030	ND
34	22,2	Isobutirato de heptila	2349-13-5	C11H22O2	1247±1	1246	ND			0,0190	±	0,0048	ND
35	22,4	Geraniol	106-24-1	C10H18O	1255±3	1250	1,0079	±	0,0040	0,0224	±	0,0065	0,0516 ± 0,0023
36	23,5	(Z)-Undec-6-en-2-ona	107853-70-3	C11H20O	1274±NA	1274	0,2124	±	0,0244	ND			0,0634 ± 0,0136
37	24,1	8-Metilnonanoato de metila	5129-54-4	C11H22O2	1277±NA	1287	ND			ND			0,1505 ± 0,0252
38	24,3	2-Undecanona	112-12-9	C11H22O	1294±2	1292	0,6527	±	0,0519	0,1883	±	0,0511	0,4179 ± 0,0661
39	24,8	2-Undecanol	1653-30-1	C11H24O	1307±4	1302	ND			0,0395	±	0,0065	ND
40	25,0	Metil (Z)-4-decenoato	1191-02-2	C11H20O2	NA	1307	ND			0,3158	±	0,0763	1,6317 ± 0,2994
41	25,6	<i>trans</i> -Geraniato de metila	1189-09-9	C11H18O2	1324±2	1320	0,4456	±	0,0005	0,2622	±	0,0638	0,1026 ± 0,0145
42	26,6	α -Cubeneno	17699-14-8	C15H24	1351±2	1343	0,0306	±	0,0033	ND			0,0534 ± 0,0043
43	26,7	Isobutirato de n-octila	109-15-9	C12H24O2	1346±3	1344	ND			0,0287	±	0,0074	ND
44	27,3	2-metil-1-undecanal	110-41-8	C12H24O	1365±2	1358	0,0620	±	0,0098	ND			ND
45	27,6	Ylangeno	14912-44-8	C15H24	1372±2	1364	0,5011	±	0,0568	0,1145	±	0,0339	0,1948 ± 0,0296
46	27,9	Copaeno	3856-25-5	C15H25	1376±2	1371	1,8634	±	0,2077	0,5691	±	0,1031	0,5130 ± 0,0783
47	28,5	(+)-Sativeno	3650-28-0	C15H24	1396±0	1385	0,0429	±	0,0025	0,0113	±	0,0031	ND
48	28,8	2-Dodecanona	6175-49-1	C12H24O	1396±9	1393	ND			ND			0,1124 ± 0,0201
49	29,1	Isocariofileno	118-65-0	C15H24	1406±3	1398	ND			ND			0,0504 ± 0,0095
50	29,5	<i>cis</i> - α -Bergamoteno	18252-46-5	C15H24	1415±3	1409	ND			0,0187	±	0,0060	ND
51	29,7	Cariofileno	87-44-5	C15H24	1419±3	1414	12,9262	±	0,4946	9,4133	±	0,2803	23,6843 ± 1,2782
52	30,1	β -Copaeno	18252-44-3	C15H24	1432±3	1424	0,3567	±	0,0608	0,0667	±	0,0145	0,3057 ± 0,0437
53	30,4	α -Bergamoteno	13474-59-4	C15H24	1435±3	1429	1,9188	±	0,0244	0,8366	±	0,0969	ND

No.	t_R (min)	Composto*	CAS	Fórmula	Lit. RI ^a	Exp. RI ^b	Área cromatográfica relativa (%) (Valores médios $\pm$ SD para n=3)								
							CASC			ENIG			ZAPP		
54	31,3	Humuleno	6753-98-6	C15H24	1454 $\pm$ 3	1451	37,6843	$\pm$	0,8950	22,0169	$\pm$	1,0923	12,3631	$\pm$	1,1516
55	31,3	(E)- β -Farneseno	18794-84-8	C15H24	1457 $\pm$ 2	1452	ND			7,8769	$\pm$	0,2327	ND		
56	32,0	γ -Selineno	515-17-3	C15H24	1479 $\pm$ 6	1468	ND			1,0421	$\pm$	0,0920	ND		
57	32,1	γ -Muuroleno	30021-74-0	C15H24	1477 $\pm$ 3	1470	3,6014	$\pm$	0,2510	0,8672	$\pm$	0,0684	2,6978	$\pm$	0,4025
58	32,6	β -Eudesmeno	17066-67-0	C15H24	1486 $\pm$ 3	1483	4,4862	$\pm$	0,1164	6,7028	$\pm$	0,3217	2,8692	$\pm$	0,4124
59	32,9	α -Selineno	473-13-2	C15H24	1494 $\pm$ 3	1490	4,0265	$\pm$	0,2012	7,9672	$\pm$	0,3473	2,6219	$\pm$	0,3578
60	33,0	α -Muuroleno	10208-80-7	C15H24	1499 $\pm$ 3	1493	1,0388	$\pm$	0,2004	0,3349	$\pm$	0,0259	0,6550	$\pm$	0,0779
61	33,5	3,6-Dodecadienoato de metila	16106-01-7	C13H22O2	NA	1504	ND			0,4518	$\pm$	0,0331	0,1824	$\pm$	0,0228
62	33,6	β -Bisaboleno	495-61-4	C15H24	1509 $\pm$ 3	1506	0,1976	$\pm$	0,1127	ND			ND		
63	33,6	γ -Cadineno	39029-41-9	C15H24	1513 $\pm$ 2	1507	2,6860	$\pm$	0,2529	1,2033	$\pm$	0,0577	7,2685	$\pm$	0,5720
64	33,8	δ -Cadineno	483-76-1	C15H24	1524 $\pm$ 2	1513	2,8384	$\pm$	0,1885	1,5243	$\pm$	0,0913	1,9931	$\pm$	0,2319
65	33,9	Calameneno	483-77-2	C15H22	1523 $\pm$ 5	1516	0,9033	$\pm$	0,0064	ND			0,3754	$\pm$	0,0489
66	34,0	Zonareno	41929-05-9	C15H24	1527 $\pm$ N/A	1517	ND			0,1664	$\pm$	0,0134	ND		
67	34,4	Cadinadieno-1,4	16728-99-7	C15H24	1533 $\pm$ 4	1527	0,0326	$\pm$	0,0003	0,1081	$\pm$	0,0199	0,0419	$\pm$	0,0068
68	34,6	α -Cadineno	24406-05-1	C15H24	1538 $\pm$ 1	1531	0,3505	$\pm$	0,0123	0,0923	$\pm$	0,0152	0,1483	$\pm$	0,0282
69	34,7	α -Calacoreno	21391-99-1	C15H20	1542 $\pm$ 3	1535	0,2053	$\pm$	0,0014	ND			0,0583	$\pm$	0,0110
70	36,1	(Z)-Tetradec-6-en-2-ona	NA	C14H26O	1570 $\pm$ N/A	1569	0,1466	$\pm$	0,0121	ND			ND		
71	36,3	Óxido de cariofileno	1139-30-6	C15H24O	1581 $\pm$ 2	1575	0,5825	$\pm$	0,0260	ND			2,1205	$\pm$	0,1589
72	37,3	Epóxido de humuleno I	19888-33-6	C15H24O	1604 $\pm$ 3	1602	0,3161	$\pm$	0,0358	0,0102	$\pm$	0,0011	0,0498	$\pm$	0,0056
73	37,4	Epóxido de humuleno II	19888-34-7	C15H24O	1606 $\pm$ 2	1602	2,3933	$\pm$	0,0451	ND			0,6809	$\pm$	0,0629

Abreviações: t_R - Tempo de retenção; RI - Índice de retenção; CASC - Cascade; ENIG - Enigma; ZAPP - Zappa; NA - Não aplicável ou não encontrado; ND - Não detectado.
*Identificação tentativa;

^a Lit. RI, índices de retenção da literatura para os compostos em uma coluna não polar “*semi-standard*”, 5% de fenil usando a biblioteca NIST 11;

^b Exp. RI, índice de retenção experimental calculado pela equação de Van den Dol e Kratz;

Anexo A - Composição da água utilizada na produção de cerveja do capítulo 3**Tabela A.26:** Características da água aplicada nas receitas de fermentação.

Classificação:	Água mineral fluoretada
<i>Composição química</i>	
Composto	Concentração (mg L⁻¹)
Bário	0,142
Bicarbonato	100,53
Cálcio	4,170
Cloreto	0,90
Estrôncio	0,041
Fluoreto	0,94
Fosfato	0,76
Magnésio	0,999
Potássio	2,480
Sódio	32,500
Sulfato	1,75
<i>Características Físico-Químicas</i>	
pH a 25°C	7,32
Temperatura da água na fonte	21,8 °C
Condutividade a 25 °C	190,6 µS cm ⁻¹
Resíduo de evaporação a 180 °C, calculado	137,51 mg L ⁻¹

Fonte: Informações do rótulo da água Crystal®.