

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Marden Claret Fontoura Teixeira

**MODELAGEM QUIMIOMÉTRICA PARA ANÁLISE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
LÚPULO: quantificação de β -mirceno e análise exploratória de perfis químicos**

Belo Horizonte

2024

UFMG/ICEX/DQ. 1.587

D. 862

Marden Claret Fontoura Teixeira

**MODELAGEM QUIMIOMÉTRICA PARA ANÁLISE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE
LÚPULO: quantificação de β -mirceno e análise exploratória de perfis químicos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre(a) em Química.

Orientador(a): Marcelo Martins de Sena

Coorientador(a): Bruno Gonçalves Botelho

Belo Horizonte

2024

Ficha Catalográfica

T266m Teixeira, Marden Claret Fontoura.
2024 Modelagem quimiométrica para análise de óleos essenciais de lúpulo [manuscrito] :
D quantificação de β -mirceno e análise exploratória de perfis químicos / Marden Claret
Fontoura Teixeira. 2024.
93 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Marcelo Martins de Sena.
Coorientador: Bruno Gonçalves Botelho.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais – Departamento de
Química.

Bibliografia: f. 84-90.
Apêndice: f. 91-93.

1. Química analítica – Teses. 2. Quimiometria – Teses. 3. Cerveja – Teses. 4.
Terpenos – Teses. 5. Essências e óleos essenciais – Teses. 6. Análise cromatográfica –
Teses. 7. Espectroscopia de infravermelho – Teses. I. Sena, Marcelo Martins de,
Orientador. II. Botelho, Bruno Gonçalves, Coorientador. III. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**"Modelagem Quimiométrica na Análise de Óleos Essenciais de Lúpulo: Quantificação de β -mircenol e Análise Exploratória de Perfis Químicos"****Marden Claret Fontoura Teixeira**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Marcelo Martins de Sena - Orientador
UFMGProf. Bruno Gonçalves Botelho - Coorientador
UFMGProfa. Adriana Nori de Macedo
UFMGProfa. Leticia Malta Costa
UFMG

Belo Horizonte, 24 de janeiro de 2024.

Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior**, em 24/01/2024, às 12:20, 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 Gonçalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 24/01/2024, às 12:20, 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 **Leticia Malta Costa, Professora do Magistério Superior**, em 24/01/2024, às 12:33, 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 **Marcelo Martins de Sena, Professor do Magistério Superior**, em 24/01/2024, às 12:38, 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 **2982341** e o código CRC **C7AD5282**.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus e por ter me guiado em todo meu percurso ao longo desses anos e à minha família por todo apoio e ajuda.

Agradeço a meus amigos Samuel Breder, Luísa Viau, Rodrigo Malheiros, Kaio Augusto pela eterna amizade desde 2016 e por estarem comigo apoiando em todos os momentos.

Agradeço ao Lucas Faria meu melhor amigo desde a infância.

Agradeço ao Fernando, diretor do cursinho MaxOpção pela enorme oportunidade de estudar para o Enem com bolsa onde acabei conhecendo os professores Leônidas Rocha, Márcio, Gabriel, Lucão, Célio, dentre outros que foram essenciais para minha preparação. Sem vocês nem sequer estaria aqui na UFMG, portanto deixo minha imensa gratidão.

Deixo um agradecimento especial ao Professor Marcelo Sena por ter me dado a oportunidade de fazer parte do LAMS e ao Professor Bruno Botelho por terem sido ambos meus orientadores durante essa trajetória. Assim como o Jimmy (também conhecido como Glaucimar), Jaime, Denise, Júlia, Victor, Vitória, Flávia, e todos os integrantes do LAMS por toda a ajuda e carinho.

Também aos novos integrantes do LAMS, Flávia Lópes, Ludmila, Stephanie e Gabriel. Um enorme orgulho fazer parte desse grupo.

RESUMO

Este trabalho visou desenvolver um modelo quimiométrico PLS (*Partial Least Squares*) para a quantificação de β -mirceno em óleos essenciais de lúpulo por espectroscopia no infravermelho médio por transformada de Fourier com acessório de reflectância total atenuada (ATR-FTIR), bem como realizar análises exploratórias dos dados por meio de modelos PCA (*Principal Component Analysis*) e HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*), utilizando-se uma metodologia por cromatografia gasosa como referência. A extração dos óleos essenciais foi realizada em um sistema de Clevenger, conforme as normas da ASBC (*American Society of Brewing Chemists*). O método da análise cromatográfica desenvolvido demandou pouco volume de amostra, apenas 20 μL , e o tempo de corrida foi de 18 minutos. Validou-se estatisticamente a regressão linear do método cromatográfico em uma faixa de 0,75 a 1,75 % v/v. A precisão intermediária e a exatidão foram avaliadas por meio de outros testes, conforme os guias de validação da ISO 17025. Os modelos PCA e HCA se mostraram úteis para a identificação de padrões de agrupamentos dos óleos em relação ao teor de β -mirceno e de outros compostos relevantes presentes no óleo. O modelo PLS apresentou bom desempenho de acordo com a estimativa de várias figuras de mérito, obtendo-se valores de RPD (razão de desempenho do desvio) de calibração e validação, respectivamente, de 2,60 e 2,59, além de uma razão RMSEP/RMSEC (raízes quadradas dos erros médios quadráticos de previsão e calibração) menor do que 2,5, indicando ausência de sobreajuste. Dessa forma, o modelo PLS pode ser utilizado como um método de *screening*, visando enorme economia de tempo de preparo de amostra, custo de análise e sem consumo de solventes, estando em conformidade com os conceitos de química verde.

Palavras-chave: cerveja; mirceno; calibração multivariada; infravermelho médio; cromatografia gasosa.

ABSTRACT

This study aimed to develop a chemometric PLS (Partial Least Squares) model for quantifying β -myrcene in hop essential oils using ATR-FTIR (Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared) spectroscopy. Additionally, an exploratory analysis of the data was conducted through PCA (Principal Component Analysis) and HCA (Hierarchical Cluster Analysis) models, using gas chromatography for obtaining the reference values. The extraction of essential oils was performed according to ASBC (American Society of Brewing Chemists) standards using a Clevenger system. The developed chromatographic analysis methodology required a small sample volume of only 20 μ L, with a runtime of 18 minutes. The linear regression of the chromatographic method was statistically validated within a range of 0.75-1.75% v/v. Intermediate precision and accuracy were assessed according to ISO 17025 validation guidelines. PCA and HCA models proved highly useful in identifying patterns of oil samples clusters, not only concerning β -myrcene content but also related to the contents of other compounds. The PLS model demonstrated good performance according to the estimate of proper figures of merit, yielding calibration and validation RPD (Ratio of Performance to Deviation) values of 2.60 and 2.59, respectively, with an RMSEP/RMSEC (Root Mean Squares Errors of Prediction and Calibration) ratio below 2.5, an indication of absence of overfitting. Consequently, the PLS model can be utilized as a screening method, leading to substantial savings in sample preparation time, analysis costs, and solvent consumption, aligned with green chemistry concepts.

Keywords: beer; myrcene; multivariate calibration; mid-infrared; gas chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Imagem indicando em (a) os cones de lúpulo da planta feminina e (b) a estrutura interna do cone com ênfase em algumas regiões específicas.....	17
Figura 2 - Regiões latitudinais mais propícias para o cultivo de lúpulo, entre 35° e 55° norte e sul, com ênfase em alguns países com produção relevante.....	18
Figura 3 - Gráfico dos principais países produtores de lúpulo nos anos de 2021 e 2022. Valores em toneladas.....	19
Figura 4 - Dados da produção de lúpulo, em toneladas, dos EUA e Alemanha de 1970 aos anos atuais (BARTHHAAS, 1970 - 2022).	21
Figura 5 - Mapa coroplético indicando a quantidade de produtores de lúpulo em cada estado brasileiro (PAULO; RIBEIRO, 2022).....	22
Figura 6 - Diferentes formas de comercialização do lúpulo, sendo elas: (a) lúpulo em <i>pellets</i> , (b) flor seca e (c) extrato de lúpulo.....	23
Figura 7 - Esquema interno de uma máquina peletizadora industrial. A máquina gira no sentido anti-horário, no qual o lúpulo prensado é expelido pelos furos na forma de cilindros.	24
Figura 8 - Fracionamento das resinas com valores de concentração em relação a massa de lúpulo em flor seca (ALMAGUER et al., 2014).	27
Figura 9 – Estrutura química dos cinco principais α -ácidos e suas faixas de concentrações em % m/m reportadas na literatura.	28
Figura 10 - Mecanismo da reação de isomerização dos α -ácidos em iso- α -ácidos, neste caso representado pela humulona.....	29
Figura 11 - Estrutura química dos principais β -ácidos, chamados de lupulonas e suas faixas de concentrações em % m/m reportadas na literatura.....	30
Figura 12 - Estruturas químicas dos principais terpenos encontrados nos óleos essenciais e suas faixas de concentrações em % v/v reportadas na literatura.....	31
Figura 13 – Principais compostos oxigenados encontrados nos óleos essenciais e suas faixas de concentrações em % m/m reportadas na literatura. Tr significa nível traço.....	33
Figura 14 – Fluxograma esquematizando o processo tradicional de fabricação de cerveja.	34
Figura 15 - Esquema de separação de dois analitos A e B ao longo de uma coluna cromatográfica.	36
Figura 16 - Esquema instrumental de um equipamento típico de cromatografia gasosa.	37
Figura 17 - (a) Imagem indicando o volume de óleo essencial extraído, observando-se uma leitura de 0,7 mL. (b) Sistema de extração de Clevenger. Fotos de autoria própria.	46
Figura 18 - Espectrômetro Perkin Elmer®, modelo Frontier Single Range.....	48

Figura 19 - Equipamento GC-MS QP2010 Plus Shimadzu®.....	49
Figura 20 - Histograma dos volumes de óleos essenciais. Parênteses significa que o valor não está incluído no intervalo. Colchete significa que o valor está incluído. Exemplo: (0,56, 1,12] significa maior que 0,56 e menor ou igual a 1,12.	53
Figura 21 - Histograma sobre as concentrações de mirceno. Parênteses significa que o valor não está incluído no intervalo. Colchete significa que o valor está incluído. Exemplo: (13, 23] significa maior que 13 e menor ou igual a 23.	54
Figura 22 – Cromatograma típico para uma amostra de óleo essencial, contendo o padrão interno 1-octanol.	55
Figura 23 - Espectro de massas para o (a) β -mirceno e o (b) 1-octanol.....	55
Figura 24 - Regressão linear para o ajuste do método cromatográfico.	57
Figura 25 - a) Espectros no IR-médio no modo de absorvância para as 54 amostras. b) Espectros pré-processados com a primeira derivada.	62
Figura 26 - Gráfico de Variância Capturada por Componente Principal.	63
Figura 27 – a) Gráfico de escores de PC1 x PC2 com ênfase nas concentrações de mirceno e b) Gráfico de escores com diagramas dos grupos. Quadrados azuis indicam amostras de alto teor de β -mirceno, cruces verdes amostras de teor médio, e triângulos vermelhos amostras de teor baixo.	64
Figura 28 - a) Gráfico de <i>loadings</i> na PC1. b) Gráfico de <i>loadings</i> na PC2.....	67
Figura 29 - Modelo HCA para as amostras de óleos essenciais contendo teores de β -mirceno para as amostras.....	69
Figura 30 - Modelo HCA para as amostras de óleos essenciais divididas em 6 grupos (G1 a G6) pela linha pontilhada de distância 3,5.	70
Figura 31 - Conjunto de espectros no IR-médio pré-processado com a segunda derivada e alisamento Savitzky-Golay.....	75
Figura 32 - Valores de RMSECV por Variável Latente.....	76
Figura 33 – Ajuste para o modelo PLS, mostrando os valores de referência versus valores previstos. Círculos pretos: amostras do conjunto de calibração. Triângulos vermelhos: amostras do conjunto de validação.....	77
Figura 34 – Vetores informativos do modelo PLS. (a) Vetor dos coeficientes de regressão e (b) Escores VIP com ênfase nas regiões R1, R2 e R3.	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do lúpulo em flor seca	26
Tabela 2 - ANOVA Curva de Calibração	58
Tabela 3 - Resumo dos parâmetros dos testes estatísticos para avaliar a linearidade do método cromatográfico.....	59
Tabela 4 – Concentrações de dois componentes dos óleos essenciais de lúpulo para as amostras dos grupos G4, G5 e G6	72
Tabela 5 – Composição dos óleos essenciais de lúpulo para os grupos G1, G2 e G3 (definidos de acordo com a Figura 31).....	73
Tabela 6 - Valores das principais figuras de mérito para o modelo PLS	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Condições instrumentais aplicadas nas quantificações dos óleos essenciais extraídos do lúpulo	50
Quadro 2 – Resumo da classificação das amostras pelos teores dos compostos chave	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ASBC	–	American Society of Brewing Chemists
ATR	–	Attenuated Total Reflection
EBC	–	European Brewing Chemists
GCMS	–	Gas Chromatography Mass Spectrometry
HCA	–	Hierarchical Cluster Analysis
HPLC	–	High Performance Liquid Chromatography
PCA	–	Principal Component Analysis
PCR	–	Principal Component Regression
PLS	–	Partial Least Squares
RMSEC	–	Root Mean Square Error of Calibration
RMSECV	–	Root Mean Square Error of Cross-Validation
RMSEP	–	Root Mean Square Error of Prediction
RPD	–	Ratio of Performance to Deviation

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1.	OBJETIVO GERAL	15
1.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
1.3.	ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO.....	15
2.	CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1.	LÚPULO.....	16
2.1.1.	Aspectos gerais.....	16
2.1.2.	Produção mundial e no Brasil	18
2.1.3.	Peletização e produtos de lúpulo	23
2.1.4.	Química do lúpulo	26
2.1.5.	Lúpulo no processo cervejeiro	34
2.2.	CROMATOGRAFIA GASOSA	35
2.3.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.....	37
2.4.	QUIMIOMETRIA	38
2.4.1.	PCA.....	40
2.4.2.	HCA	42
2.4.3.	PLS.....	43
3.	PARTE EXPERIMENTAL	46
3.1.	EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	46
3.2.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO MÉDIO	48
3.3.	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	48
3.4.	CONSTRUÇÃO DOS MODELOS QUIMIOMÉTRICOS	51
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1.	ÓLEOS ESSENCIAIS	52
4.2.	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	54
4.3.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	56
4.3.1.	Linearidade	56
4.3.2.	Estimativa do LQ e LD	59
4.3.3.	Precisão intra-dia	60
4.4.	MODELOS QUIMIOMÉTRICOS	61
4.4.1.	PCA.....	61

4.4.2.	HCA	68
4.4.3.	PLS	74
5.	CONCLUSÕES	82
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICE – INFORMAÇÕES REFERENTES ÀS AMOSTRAS.....	91

1 INTRODUÇÃO

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma planta pertencente à família Cannabaceae, amplamente utilizada na indústria cervejeira devido às suas características aromáticas e conservativas, contribuindo principalmente para o aroma e amargor da cerveja (HIERONYMUS, 2014). Além do seu papel fundamental na produção da bebida, o lúpulo tem sido reconhecido por suas propriedades medicinais e terapêuticas, principalmente devido à presença de compostos bioativos em seus óleos essenciais (LIN et al., 2019; POŁEĆ et al., 2020; RUBERTO; BARATTA, 2000). Os óleos essenciais do lúpulo são uma rica fonte de diversos compostos voláteis, dos quais o β -mirceno, um hidrocarboneto monoterpênico geralmente presente em uma faixa de 0,5 – 60% do óleo, se destaca constituindo-se como composto majoritário na maioria das variedades de lúpulo (HANS MICHAEL ESSLINGER, 2009).

Por se tratar de uma molécula de caráter altamente apolar, o β -mirceno é quase totalmente perdido nos processos cervejeiros, estando presente em concentrações extremamente baixas na bebida (HASLBECK et al., 2017). Desse modo, a determinação da concentração de β -mirceno nos óleos essenciais possibilita indicar de maneira indireta o percentual máximo de extração dos outros compostos aromáticos do óleo para a cerveja, que podem influenciar diretamente no perfil sensorial e nas características organolépticas da bebida. Por exemplo, se uma variedade de lúpulo apresenta 40% de teor de β -mirceno, no máximo 60% dos outros compostos presentes no óleo podem ser extraídos para a bebida.

A cromatografia gasosa desempenha um papel fundamental na análise de óleos essenciais devido à sua capacidade de separação eficiente dos diferentes componentes do óleo, possibilitando a identificação e quantificação dos compostos individualmente (CAGLIERO et al., 2022). No entanto, os métodos cromatográficos geralmente demandam preparo de amostras laboriosos, longos tempos de análises, fazendo uso de grandes quantidades de solventes, e tornando a análise não muito prática em situações de grandes amostragens, como na produção de lúpulo. Por outro lado, as técnicas espectroscópicas possibilitam a análise direta da amostra, a aquisição dos dados é realizada de maneira extremamente rápida, além de não utilizar

solventes tóxicos, seguindo os conceitos de química verde (HE et al., 2007) Nesse contexto, as ferramentas quimiométricas surgem como boa alternativa não somente para fins quantitativos, como também para análises discriminantes de amostras (KHARBACH et al., 2023). Dessa forma, modelos de calibração multivariada como o PLS (*Partial Least Squares*), fornecem a possibilidade de se usar técnicas espectroscópicas para esses propósitos, contornando as desvantagens das técnicas cromatográficas (ROBERTS; COZZOLINO, 2016).

1.1. Objetivo geral

Desenvolver um método rápido, prático e com pouco preparo de amostra para a determinação da concentração de β -mirceno em óleos essenciais de lúpulo, empregando um modelo quimiométrico quantitativo PLS em conjunto com espectroscopia no infravermelho médio.

1.2. Objetivos específicos

- Desenvolver um método de referência para quantificação do teor de β -mirceno, através da cromatografia gasosa.
- Validar estatisticamente a metodologia cromatográfica desenvolvida, através da ANOVA e guias de validação da ISO 17025.
- Realizar análises exploratórias discriminantes em relação ao perfil químico dos óleos essenciais por meio de ferramentas quimiométricas como o PCA e HCA (ABNT, 2017).

1.3. Estrutura da dissertação

A dissertação está dividida em: Introdução, Conceitos Gerais e Revisão da Literatura, Parte Experimental, Resultados e Discussão, Conclusão, Referências e Apêndice – Informações Referentes às Amostras.

2. CONCEITOS GERAIS E REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Lúpulo

2.1.1. Aspectos gerais

Lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é um dos quatro ingredientes essenciais para a produção de cerveja, sendo os outros três água, malte e levedura (PALMER, 2022). Ele é um insumo de altíssima relevância e complexidade, tendo como principais finalidades no processo de produção da cerveja: conferir aroma, amargor, propriedades antimicrobianas e estabilidade da espuma para a bebida (HIERONYMUS, 2020).

Em relação à sua classificação taxonômica, o lúpulo define-se como uma angiosperma da ordem das Rosales, pertencente à família Cannabaceae, que abrange 10 gêneros ao todo, sendo eles: *Cannabis*, *Humulus*, *Aphananthe*, *Celtis*, *Chaetachme*, *Gironniera*, *Lozanella*, *Parasponia*, *Pteroceltis* e *Trema* (MURAKAMI et al., 2006). Por muito tempo, a comunidade acadêmica considerava a família Cannabaceae constituída apenas por dois gêneros: *Humulus* e *Cannabis*. No entanto, estudos filogenéticos recentes abrangem oito gêneros adicionais baseado em suas similaridades por DNA (YANG et al., 2013). O gênero *Humulus* é constituído por três espécies: *H. lupulus*, *H. yunnanensis* e *H. scandens* - antigamente denominado *H. japonicus*, popularmente conhecido como “lúpulo japonês”. Como apenas a espécie *H. lupulus* produz flores resinosas, somente ela é utilizada para fins cervejeiros (ALMAGUER et al., 2014).

Botanicamente, o lúpulo se caracteriza como uma planta trepadeira, perene e dioica, possuindo um ciclo de vida, geralmente, de 40 anos e altura média podendo variar entre 6 e 9 metros (MCADAM et al., 2014). Ele é uma espécie fotoperiódica de dias longos, necessitando de cerca 15 horas de exposição à luz solar para seu desenvolvimento natural (JASTROMBEK et al., 2022). Anualmente, em um período aproximado de quatro meses, a planta feminina desenvolve inflorescências, também

denominadas estróbilos, que formam o cone do lúpulo posteriormente utilizado pelas cervejarias (RUTNIK; KNEZ HRNČIČ; JOŽE KOŠIR, 2021). Esse cone, cujo tamanho médio varia entre 2 e 5 cm, consiste em estruturas semelhantes a pétalas estipuladas chamadas de brácteas (pétalas externas) e bractéolas (pétalas internas) em torno de um eixo central, “*strig*”, conforme indicado na Figura 1 (HIERONYMUS, 2020).



Figura 1 – Imagem indicando em (a) os cones de lúpulo da planta feminina e (b) a estrutura interna do cone com ênfase em algumas regiões específicas.

A lupulina é um sólido amarelado constituído por resinas, óleos essenciais e polifenóis, a qual possui grande interesse no processo cervejeiro. Ela é produzida por glândulas localizadas na base das bractéolas, de acordo com a Figura 1.b (SCHÖNBERGER; KOSTELECKY, 2011). Dessa forma, quando um produtor ou um profissional de cervejaria fala sobre lúpulo, ele está se referindo diretamente à flor da planta feminina. As resinas contêm α - e β -ácidos, que durante o processo de produção de cerveja se isomerizam em iso- α - e iso- β -ácidos, sendo esses os compostos responsáveis pela sensação de amargor na bebida (TING; RYDER, 2017).

Dado que as plantas masculinas produzem pouca ou nenhuma lupulina, elas são utilizadas para fins de cruzamentos genéticos, podendo ter como objetivo a reprodução das mudas ou o desenvolvimento de novas variedades, sendo cultivadas

em locais específicos e afastadas das plantações comerciais em ambos os casos (LAGOS; ZUFFELLATO-RIBAS; DESCHAMPS, 2022).

2.1.2. Produção mundial e no Brasil

O lúpulo é nativo da região central da Europa, tratando-se, portanto, de uma planta adaptada a climas temperados, apresentando localização ideal de cultivo nas regiões latitudinais entre 35° e 55° do hemisfério norte, conforme destacado na Figura 2 (BAUERLE, 2019).

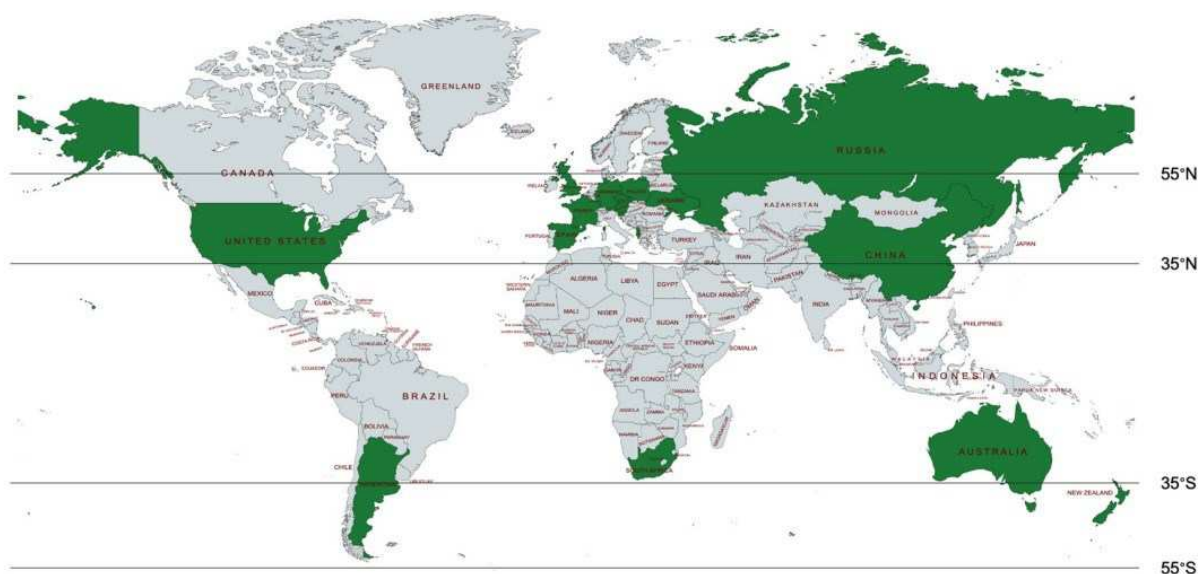


Figura 2 - Regiões latitudinais mais propícias para o cultivo de lúpulo, entre 35° e 55° norte e sul, com ênfase em alguns países com produção relevante.

Com o passar dos séculos, o cultivo de lúpulo foi-se difundindo para países fora do continente europeu, sendo explorado em países do hemisfério sul que também estão sob as regiões latitudinais entre 35 e 55°, como Argentina, Austrália e Nova Zelândia (DELYSER; KASPER, 1994). Países majoritariamente de clima tropical, como o Brasil e África do Sul, também estudam o desenvolvimento do lúpulo em seus

domínios (KUBEŠ, 2022). Ambos os países não possuem território entre as latitudes de 35 e 55°, entretanto a região sul de seus limites é caracterizada como zona de clima temperado, facilitando a adaptabilidade da planta. A África do Sul produz lúpulo em escala significativa, estando entre os 15 maiores produtores mundiais, conforme o relatório de 2022 da BarthHaas (BARTHHAAS, 2022). No caso do Brasil, as produções ainda estão em estágio inicial de estudos e avaliações, porém as pesquisas indicam dados promissores (ARRUDA et al., 2021).

De acordo com o gráfico da Figura 3, os dois países com a maior produção de lúpulo são os EUA e a Alemanha, totalizando juntos cerca de 80% da produção global (BARTHHAAS, 2021, 2022). Nos EUA, a produção está localizada no noroeste do país, abrangendo os estados de Oregon, Washington e Califórnia, produzindo principalmente os lúpulos Citra, Mosaic, Cascade, Simcoe e CTZ – este uma mistura de três lúpulos: Columbus, Tomahawk e Zeus –, enquanto na Alemanha, as principais regiões localizam-se em Hallertau, Elbe-Saale e Tettngang, e as principais variedades de lúpulos são Hérkules, Perle, Tradiction, Magnum e Hersbruck.

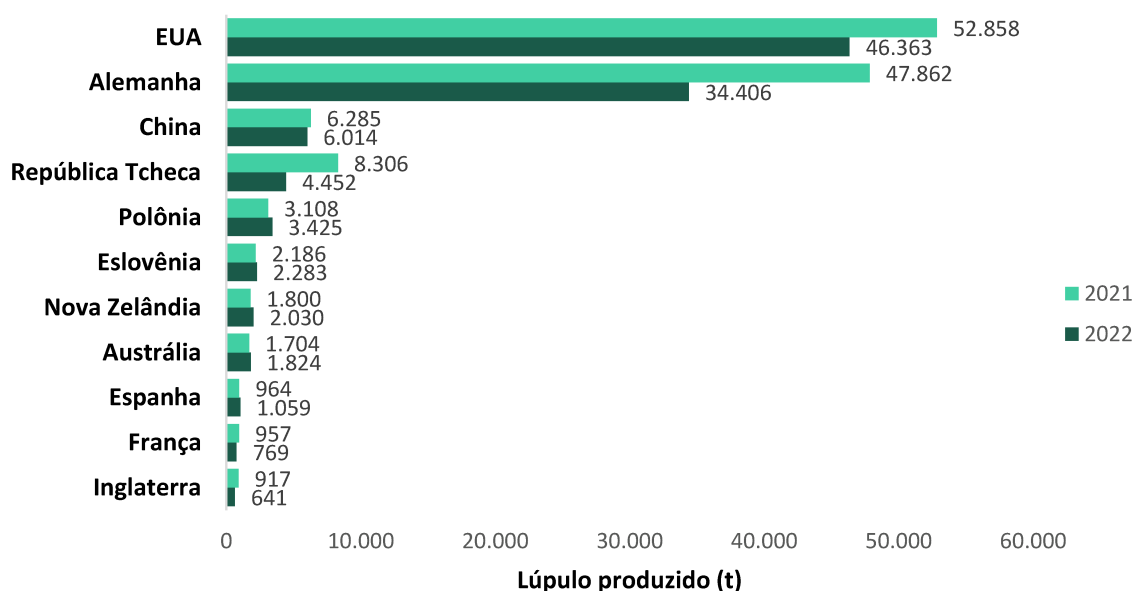


Figura 3 - Gráfico dos principais países produtores de lúpulo nos anos de 2021 e 2022. Valores em toneladas.

Alguns conjuntos de dados consideram a Etiópia entre os 10 principais produtores, entretanto trata-se de um equívoco, pois a Etiópia produz *Rhamnus prinoides*, uma planta utilizada para o processo de produção da *tella*, uma bebida muito similar à cerveja (BERHANU, 2014).

Como se pode avaliar pelo gráfico da Figura 3, houve uma significativa queda da produção no ano de 2022 para os EUA, Alemanha e República Tcheca, que representam três dos quatro maiores produtores, em comparação ao ano anterior, enquanto países como China e Eslovênia mantiveram a produção estável, sendo possível identificar até mesmo um ligeiro aumento da produção em alguns países, como Polônia, Austrália e Nova Zelândia.

Segundo o relatório da Barth Haas, intensas condições climáticas ao longo das estações e fortes tempestades de chuva e granizo prejudicaram o desenvolvimento dos lúpulos plantados em uma área de cerca de 2.000 hectares, acarretando uma queda relevante da produção no caso da Alemanha. Para a República Tcheca, que apresentou a queda mais drástica de 46%, em virtude das variações climáticas, houve um baixo desenvolvimento da variedade de lúpulo Saaz, que corresponde a aproximadamente 84% da área de plantação, resultando em um baixo rendimento total (t/ha). Tal queda na produção fez com que a República Tcheca deixasse o posto tradicional de terceiro maior produtor de lúpulo, tendo seu lugar sido ocupado pela China nesse ano. Os EUA, que apresentaram um recorde histórico de produção em 2021, também tiveram problemas com variações climáticas no ano seguinte devido ao fenômeno *El Niña*, fortes secas e inverno severo (BARTHHAAS, 2022).

Apesar dos EUA ocuparem o posto de maior produtor do mundo atualmente, é importante ressaltar que isso se trata de um fato relativamente recente. A Alemanha possui enorme tradição não somente no plantio de lúpulo, tendo sido o maior produtor por muitos séculos, além de ter grande influência no processo de produção de cerveja, fato que pode ser exemplificado com a publicação da famosa lei da pureza alemã em 1516, denominada *Reinheitsgebot*, que estabelecia que a cerveja deveria ser produzida utilizando somente água, malte e lúpulo, proibindo o uso de qualquer outro ingrediente (PIECZONKA et al., 2022). Como ilustrado na Figura 4, observa-se que

somente no século XXI os EUA se tornaram os maiores produtores (BARTHHAAS, 1970 - 2022).

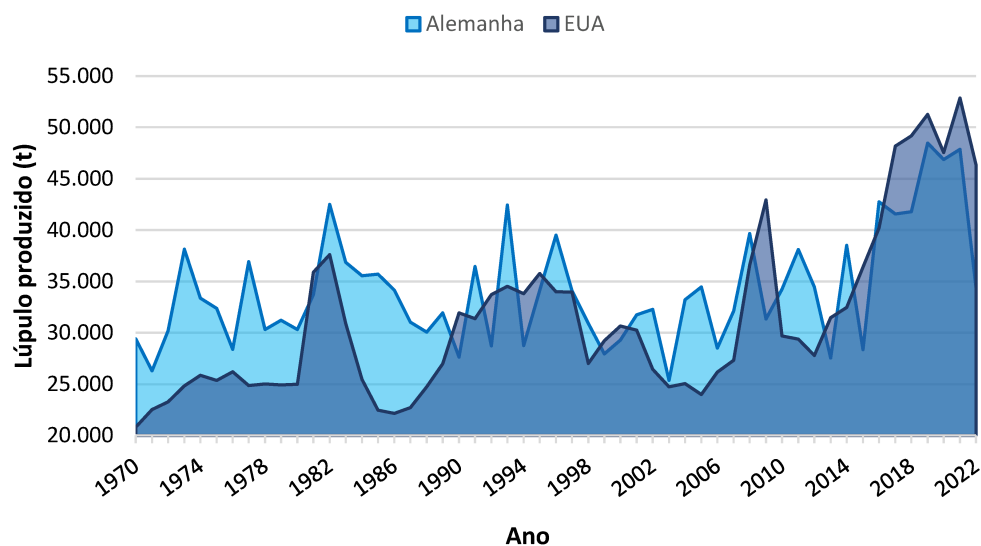


Figura 4 - Dados da produção de lúpulo, em toneladas, dos EUA e Alemanha de 1970 aos anos atuais (BARTHHAAS, 1970 - 2022).

Pode-se observar pelo gráfico que até os anos 1970 a Alemanha possuía uma produção significativamente maior. Na década de 1980, os EUA iniciaram com um pico de produção, seguido logo depois por uma drástica queda. A partir da década de 1990, a quantidade de lúpulo produzido nos EUA se tornou equivalente à da Alemanha e os dois países passaram a alternar a primeira posição, devido às oscilações de rendimento anuais das colheitas e desde 2017 os EUA mantêm o posto de maior produtor.

No caso do Brasil, pode-se dizer que o país inicia de forma lenta a produção. Segundo o Instituto Histórico e Geográfico Brasileiro, o lúpulo foi introduzido no país por imigrantes alemães por volta de 1860 na cidade de Blumenau – SC (MARCUSO, 2022). Os lúpulos não se desenvolveram adequadamente nessa época, sendo deixados de lado até que se descobriu que a suplementação das plantações com luz

LED durante o período noturno permite acelerar o crescimento da planta (BAUERLE, 2019). Com a inserção desta tecnologia, os produtores de regiões em altas latitudes, não apenas no Brasil, mas em todo o mundo, agora conseguem produzir três safras ao ano, como é feito naturalmente nos países europeus, abrindo margem para maiores investimentos no cultivo do lúpulo.

Na Figura 5, pode-se observar a distribuição dos produtores de lúpulo nos estados brasileiros (PAULO; RIBEIRO, 2022).

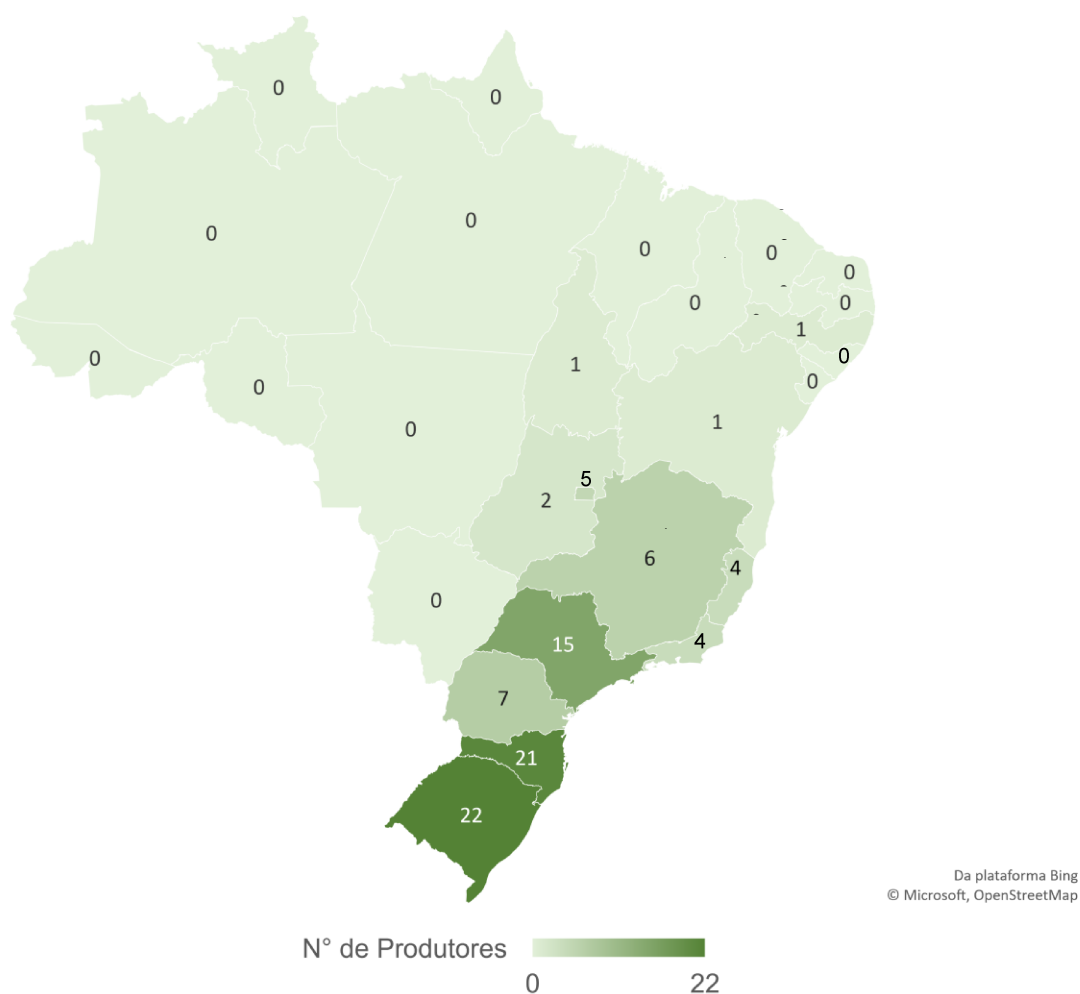


Figura 5 - Mapa coroplético indicando a quantidade de produtores de lúpulo em cada estado brasileiro (PAULO; RIBEIRO, 2022).

Observa-se que a região sul possui o maior número de agricultores, totalizando 50 produtores, seguido pela região sudeste com 29, enquanto as demais regiões possuem um número pequeno de produtores. Como explicado anteriormente, o território brasileiro está localizado majoritariamente sob clima tropical, portanto as plantações de lúpulo concentram-se em sua maioria na região Sul, como esperado, a fim de se obter as condições de clima e relevo mais similares possíveis a de países de clima temperado. Dessa forma, os produtores de lúpulo brasileiro estão conseguindo maiores rendimentos nas safras, com um panorama muito promissor no futuro, atraindo mais investimentos em pesquisas agrônômicas e em expansões de áreas de cultivo (MAPA, 2022).

2.1.3. Peletização e produtos de lúpulo

O lúpulo é comercializado de diversas formas na indústria cervejeira, sendo a principal os *pellets*, as flores secas e os extratos concentrados, como indicado na Figura 6 (HIERONYMUS, 2020).



Figura 6 - Diferentes formas de comercialização do lúpulo, sendo elas: (a) lúpulo em *pellets*, (b) flor seca e (c) extrato de lúpulo.

As flores secas consistem nos cones do lúpulo submetidos a um processo de secagem cuidadoso, realizado a temperaturas de cerca de 40 °C, visando preservar a integridade estrutural da matéria-prima. No que se refere aos extratos, a técnica predominante atualmente é a extração utilizando CO₂ em estado supercrítico, que resulta em produtos mais puros e concentrados em resinas e óleos essenciais, com uma menor presença de componentes da matriz vegetal (SANZ et al., 2019). Por outro lado, os *pellets* de lúpulo são essencialmente aglomerados de forma compactada, representando uma apresentação prática e eficiente para armazenamento e utilização durante os processos de produção cervejeira, sendo inclusive a forma mais utilizada (PALMER, 2022).

Explicando em mais detalhes o processo de peletização, os cones de lúpulos são secados em duas etapas, inicialmente a 20 – 25 °C e depois a 40 – 50 °C, até que o teor de água fique entre 7 e 9%. Em seguida, os lúpulos são macerados, obtendo-se um pó fino de 1 a 5 mm. Esse pó é levado para uma máquina peletizadora, que consiste em uma estrutura circular rotativa, contendo furos cilíndricos. O lúpulo moído é prensado internamente na máquina, com rolos de pressão, e é expelido na forma de *pellets* pelos furos da peletizadora. Os lúpulos em *pellets* são transferidos para pacotes com atmosfera modificada de nitrogênio, ou outro gás protetor, e armazenados a baixas temperaturas, de 1 a 3 °C (KUNZE, 2004).

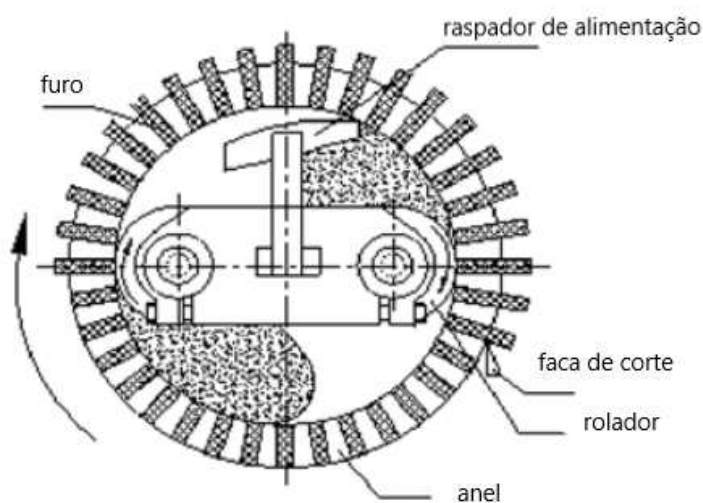


Figura 7 - Esquema interno de uma máquina peletizadora industrial. A máquina gira no sentido anti-horário, no qual o lúpulo prensado é expelido pelos furos na forma de cilindros.

Durante esse processo, praticamente todas as glândulas de lupulina são rompidas e como consequência, a taxa de aproveitamento das resinas é maior, em comparação à forma de flor seca, porém o lúpulo na forma de *pellet* oxida mais rapidamente. Ainda assim, o lúpulo em *pellets* é a forma mais utilizada nas cervejarias por apresentar maior homogeneidade de composição química, praticidade de transporte e armazenamento, boa dissolução no mosto cervejeiro e melhor consistência na produção da bebida (HIERONYMUS, 2020).

Os lúpulos em *pellets* são produzidos principalmente de três modos: *pellets* tipo 90, chamados T90, *pellets* tipo 45, ou T45, e *pellets* isomerizados. A denominação T90 significa que o lúpulo contém 90% dos componentes não-resinosos encontrados nos cones, logo a composição química dos α - e β -ácidos e óleos essenciais desses *pellets* se aproxima bastante da composição das flores. Seguindo essa lógica, os *pellets* T45 possuem cerca de metade da concentração de material vegetal fibroso comparado aos *pellets* T90, sendo chamados de lúpulos enriquecidos com lupulina. O esquema indicado na Figura 7 corresponde ao processo de peletização de um lúpulo T90, no entanto o processo de um tipo 45 é um pouco diferente, no qual a moagem deste tipo é realizada a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$, separando a lupulina sobre a matriz vegetal. Normalmente, este último processo é realizado para lúpulos com baixos teores de α -ácidos e ricos em óleos essenciais. Por último, os *pellets* isomerizados, também chamados de *isopellets*, ou pré-isomerizados, como o próprio nome sugere, para esses tipos o lúpulo já é comercializado com os α - e β -ácidos convertidos em iso- α -ácidos, por meio de uma adição de hidróxido de magnésio grau alimentício durante a peletização. O processo de isomerização será discutido em mais detalhes adiante. Por já estarem na forma isomerizada, eles necessitam de muito menos tempo de fervura, cerca de 10 a 15 minutos, comparados a todas as outras formas de lúpulo (HIERONYMUS, 2020).

2.1.4. Química do lúpulo

A química do lúpulo é altamente complexa e uma composição química típica para uma variedade de lúpulo em flor seca está indicada na Tabela 1 (DURELLO; SILVA; BOGUSZ JR., 2019).

Tabela 1 - Composição química do lúpulo em flor seca

Constituinte	Concentração (% m/m)
Resinas totais	15 – 30
Óleos essenciais	0,5 – 3
Proteínas	15
Monossacarídeos	2
Polifenóis	4
Pectinas	2
Aminoácidos	0,1
Ceras e esteroides	tr - 25
Cinzas	8
Água	10
Celulose/lignina	43

tr = traço.
 Fonte: (DURELLO; SILVA; BOGUSZ JR., 2019).

A celulose/lignina representa quase metade da composição da flor e nos constituintes provenientes da lupulina notam-se concentrações consideráveis de resinas, 15 – 30 %, e baixos teores de óleos essenciais, 0,5 – 3 %.

2.1.4.1. Resinas

A classificação das resinas é definida com base na solubilidade dos constituintes em diferentes solventes. Vários métodos de extração foram propostos ao longo dos anos, mas atualmente considera-se uma versão modificada do método de Wolmer para o fracionamento das resinas, como indicado na Figura 8 (ASBC; EBC, 1957).

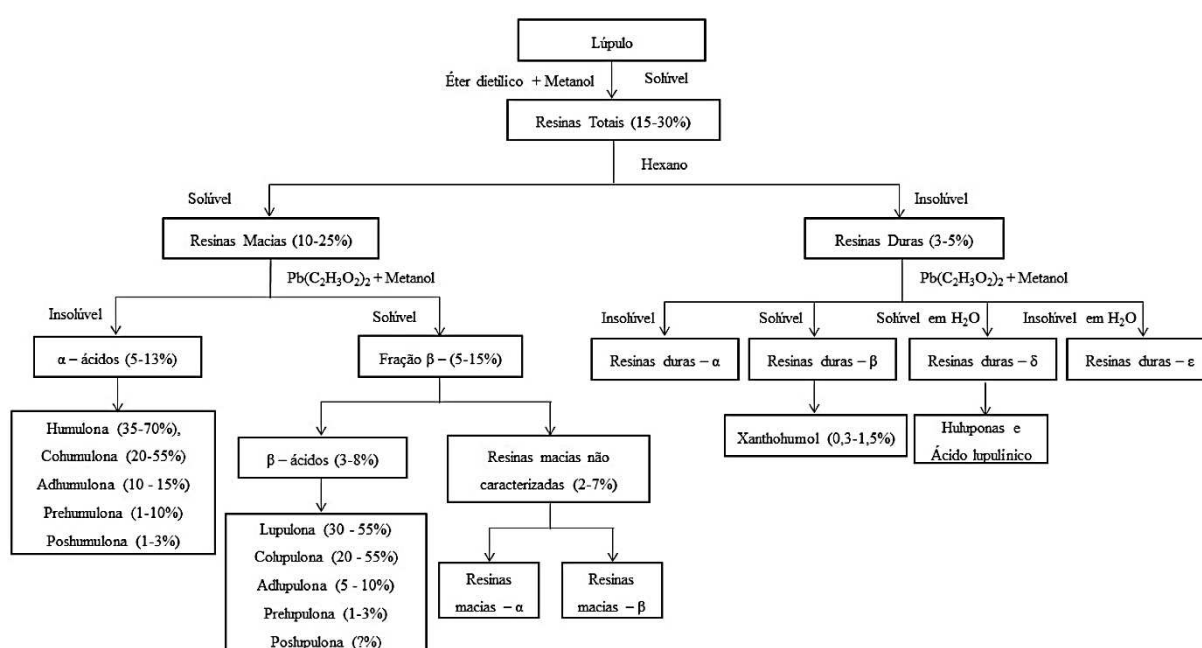


Figura 8 - Fracionamento das resinas com valores de concentração em relação a massa de lúpulo em flor seca (ALMAGUER et al., 2014).

Como apresentado no esquema acima, as resinas totais, que representam de 15 – 30 % do lúpulo, correspondem aos compostos solúveis em metanol e éter dietílico. Então, é realizado o fracionamento com hexano, no qual a fração solúvel é chamada de resina macia e a fração insolúvel é chamada de resina dura. As resinas duras não são de grande interesse, porém as resinas macias contêm os α - e β -ácidos que são uns dos compostos de maior relevância do lúpulo (ALMAGUER et al., 2014).

Os α -ácidos, dados pela humulona, cohumulona, adhumulona, prehumulona e póshumulona, representam de 5 a 13 % da massa do lúpulo em flor seca e são os principais compostos que originam a sensação de amargor na bebida. Na Figura 9 estão indicadas as estruturas químicas das humulonas e suas respectivas faixas de concentrações no total de α -ácidos (DE KEUKELEIRE et al., 2003). Pode-se observar nas humulonas um anel central de seis carbonos, contendo três grupos hidróxidos, duas ramificações alquílicas, uma cetona alicíclica e uma cetona alifática.

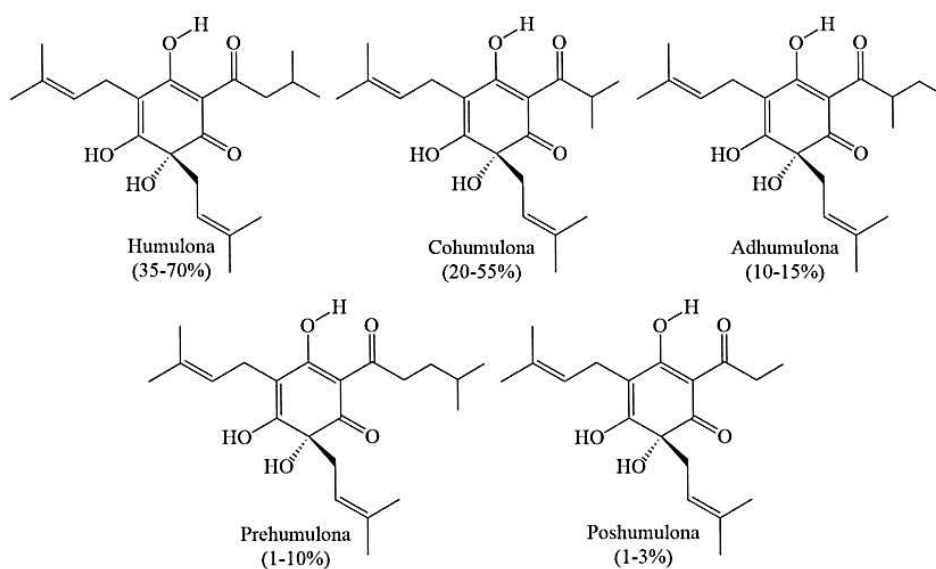


Figura 9 – Estrutura química dos cinco principais α -ácidos e suas faixas de concentrações em % m/m reportadas na literatura.

Durante a fervura do mosto, uma das etapas do processo cervejeiro, se adicionam os lúpulos a temperaturas próximas a 100 °C por 45 a 60 minutos, ocorrendo a isomerização das humulonas, formando-se os iso- α -ácidos, sendo esses os responsáveis pelo amargor da cerveja (PALMER, 2022). O mecanismo da reação de isomerização para a humulona está indicado na Figura 10. Observa-se que nesse processo, ocorre a quebra do anel central de 6 carbonos para 5 carbonos, no qual são formados um par de enantiômeros, sendo o produto *cis*-iso-humulona formado em maior concentração que o produto *trans* (MALOWICKI; SHELLHAMMER, 2005).

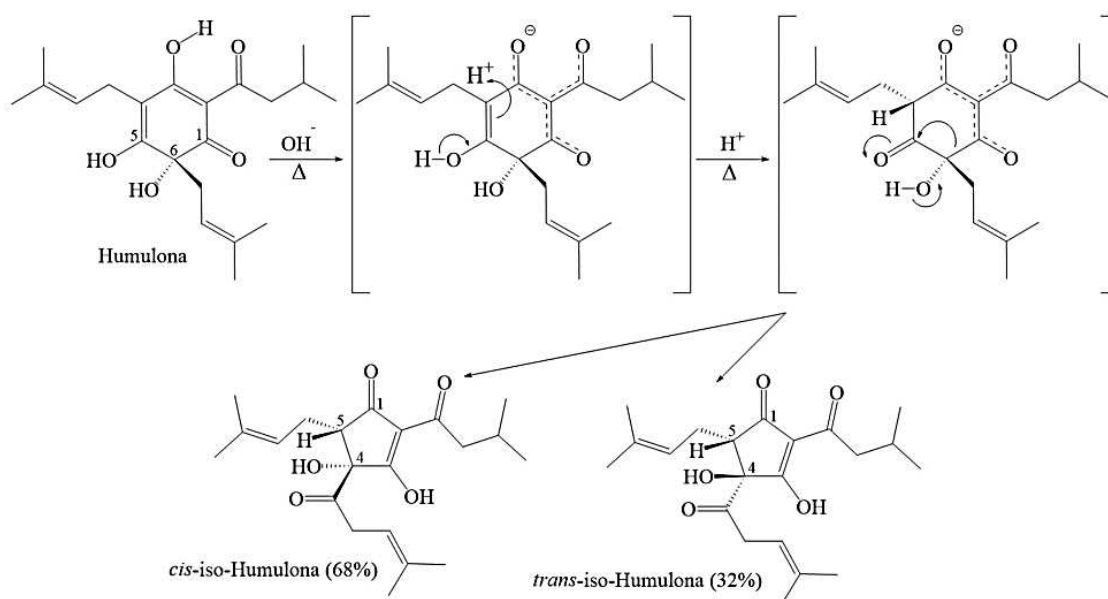


Figura 10 - Mecanismo da reação de isomerização dos α -ácidos em iso- α -ácidos, neste caso representado pela humulona.

Os β -ácidos, constituídos pela lupulona, colupulona, adlupulona, prelupulona e poslupulona, indicados na Figura 11, representam de 5 a 15% da massa de flor seca. A estrutura química dos β -ácidos é muito similar a dos α -ácidos, com a única diferença na substituição de um grupo hidróxido ligado ao anel central de seis carbonos por outro grupo alquílic. Assim como os α -ácidos, os β -ácidos também são isomerizados durante a fervura, contribuindo para o amargor da cerveja (DE KEUKELEIRE et al., 2003). Até alguns séculos atrás, acreditava-se que somente os α -ácidos eram relevantes para a sensação de amargor, no entanto foi constatado que os β -ácidos também possuem influência, apesar dos α -ácidos contribuírem com um peso maior (MOIR, 2000). A determinação da concentração dos α - e β -ácidos do lúpulo é de extrema importância, porque a quantidade de lúpulo usada nos processos cervejeiros é calculada baseado nesses valores, que são indicados nos pacotes de lúpulo peletizados (PALMER, 2022).

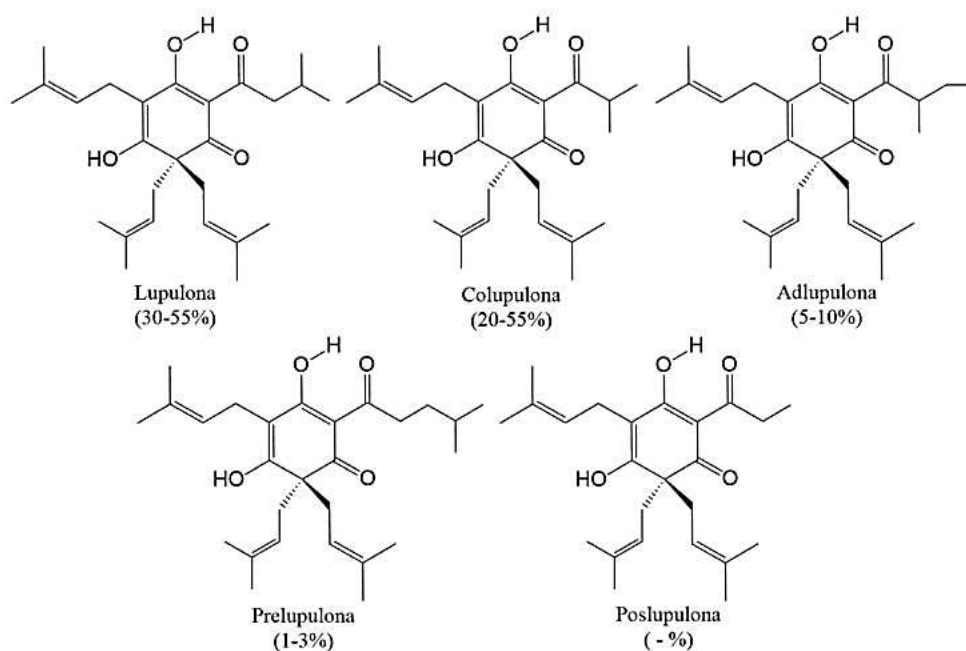


Figura 11 - Estrutura química dos principais β -ácidos, chamados de lupulonas e suas faixas de concentrações em % m/m reportadas na literatura.

2.1.4.2. Óleos essenciais

Os óleos essenciais representam de 0,5 a 3 % da massa do lúpulo em flor seca e contribuem para o aroma e sabor da cerveja (DURELLO; SILVA; BOGUSZ JR., 2019). A química dos óleos essenciais é extremamente complexa, sendo reportados mais de 500 compostos na literatura (JUSTEN, 2019). Por definição, eles consistem em uma classe de compostos voláteis extraídos através de destilação a vapor, apresentando uma vasta gama de aromas, como: cítrico, floral, vegetal, gramíneo, picante, herbal, mentolado, amadeirado e frutado (DIETZ et al., 2020). Essas características aromáticas são importantes para os profissionais de cervejarias e essas descrições são reportadas nos rótulos de lúpulo, após análises sensoriais.

Quimicamente, os óleos essenciais são constituídos em sua maioria por terpenos, divididos em monoterpenos e sesquiterpenos, compostos oxigenados, além de compostos contendo enxofre (DURELLO; SILVA; BOGUSZ JR., 2019). Os terpenos são uma classe de hidrocarbonetos formados por unidades de isopreno, um precursor fundamental para a biossíntese de vários desses compostos, apresentando

fórmula molecular $C_{5}H_8$ (DEWICK, 2009). Na Figura 12, estão indicadas as estruturas químicas dos principais compostos terpenóides reportados nos óleos essenciais (HANS MICHAEL ESSLINGER, 2009).

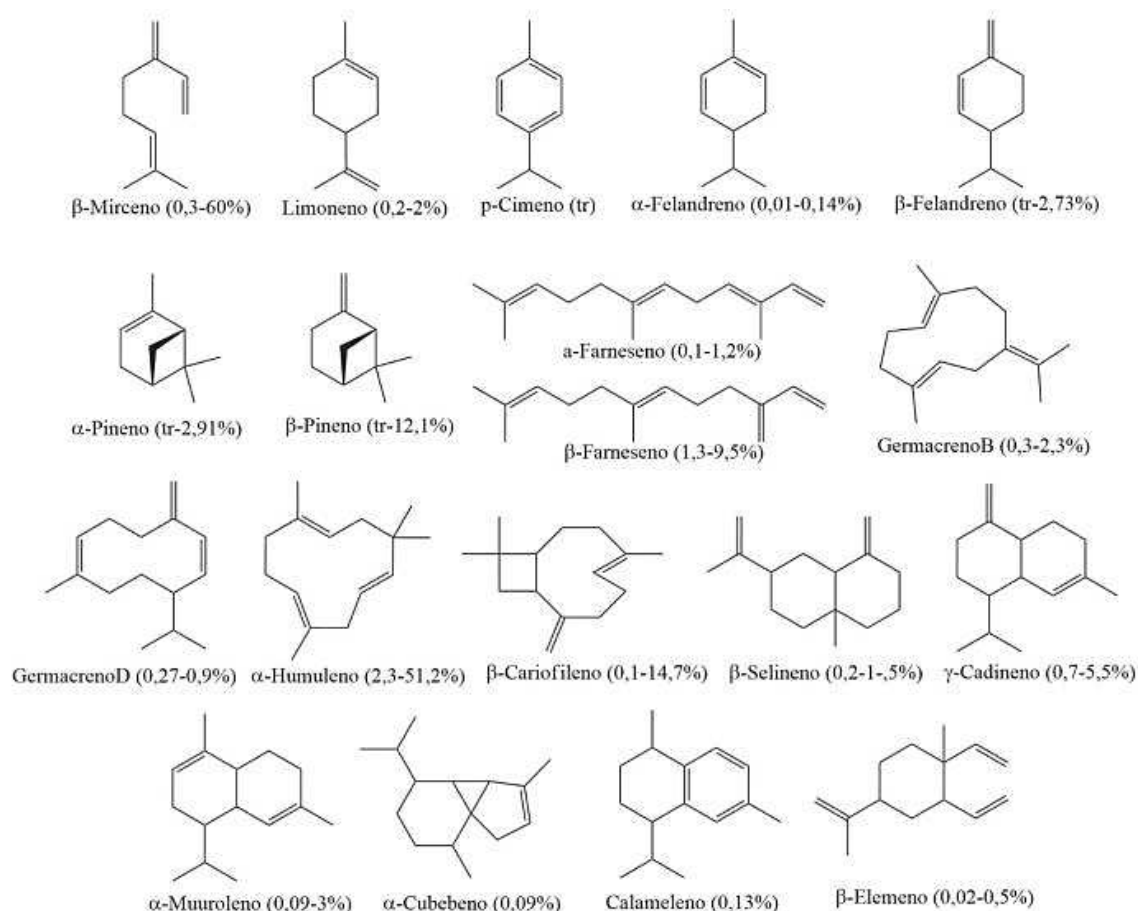


Figura 12 - Estruturas químicas dos principais terpenos encontrados nos óleos essenciais e suas faixas de concentrações em % v/v reportadas na literatura.

Os monoterpenos são formados por duas unidades de isopreno, apresentando fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, caracterizados por serem leves e altamente voláteis, contribuindo para aromas cítricos, florais e herbáceos. Os monoterpenos podem ser: acíclicos, como o β -mirceno; monocíclicos, como o limoneno, α e β -felandreno; bicíclicos, como o α - e β -pinoeno. Já os sesquiterpenos são formados por três unidades de isopreno, apresentando fórmula geral $C_{15}H_{24}$, caracterizando aromas mais

complexos, terrosos e condimentados. Os sesquiterpenos podem ser acíclicos, como o α - e β -farneseno, monocíclicos, como o α -humuleno e os germanecenos B e D, bicíclicos, como o β -cariofileno, β -selineno e β -cadineno, ou tricíclicos, como o α -cubebeno. Dentre os sesquiterpenos, os que estão presentes majoritariamente nos óleos essenciais são o α -humuleno, que apresenta notas amadeiradas, β -cariofileno, com aromas amadeirado e de especiarias, e o β -farneseno, que possui aroma cítrico, amadeirado e doce (DEWICK, 2009).

Um desses compostos mais relevantes, não apenas dentre os monoterpenos, mas dentre todos os constituintes do óleo essencial, é o β -mirceno, também chamado apenas de mirceno, que apresenta um aroma gramíneo e verde, remetendo ao aroma de lúpulo fresco (SURENDRAN et al., 2021). Além de suas características organolépticas, o β -mirceno atua como precursor de vários compostos do óleo essencial, não somente nas rotas sintéticas dos terpenos, mas também de compostos oxigenados (BEHR; JOHNEN, 2009). Por representar individualmente até 60 % do teor do óleo, e dado sua volatilidade e caráter altamente apolar, o β -mirceno é quase totalmente perdido no processo de fervura, uma das etapas da produção de cerveja (HASLBECK et al., 2017). O mesmo pode ser dito sobre os outros terpenos, entretanto na maioria das variedades de lúpulo, o β -mirceno é geralmente o composto majoritário, o que justifica sua relevância. Dessa forma, a determinação da concentração do β -mirceno no óleo essencial serve como uma medida indireta do percentual máximo do óleo essencial que pode ser extraído para a cerveja. Por exemplo, para uma amostra com 60 % do teor de mirceno, no máximo 40 % dos outros constituintes do óleo têm potencial para serem transferidos para a bebida.

Visto que os terpenos são praticamente perdidos no processo cervejeiro, a classe de compostos dos óleos essenciais mais polares e que podem ser extraídos para a bebida são os compostos oxigenados, presentes em diversas formas, tais como: álcoois terpênicos, álcoois sesquiterpênicos, álcoois alifáticos, aldeídos, ácidos carboxílicos, cetonas, epóxidos, e alguns tipos de ésteres (DURELLO; SILVA; BOGUSZ JR., 2019). As estruturas químicas dos principais compostos oxigenados estão indicadas na Figura 13.

Dentre esses compostos, os que mais se destacam são o linalol, contribuindo para um aroma floral e frutado para a bebida, citrônolol, com sabor cítrico, geraniol, por possuir um aroma floral de rosas e gerânio, e os epóxidos de humuleno, com notas mais complexas de cedro e feno (JEAN-PIERRE, 2009). Como reportado na literatura, o geraniol também pode ser transformado no citrônolol por ação das leveduras durante a etapa de fermentação, ocorrendo um efeito sinérgico de percepção de notas cítricas entre estes dois compostos (TAKOI et al., 2014).

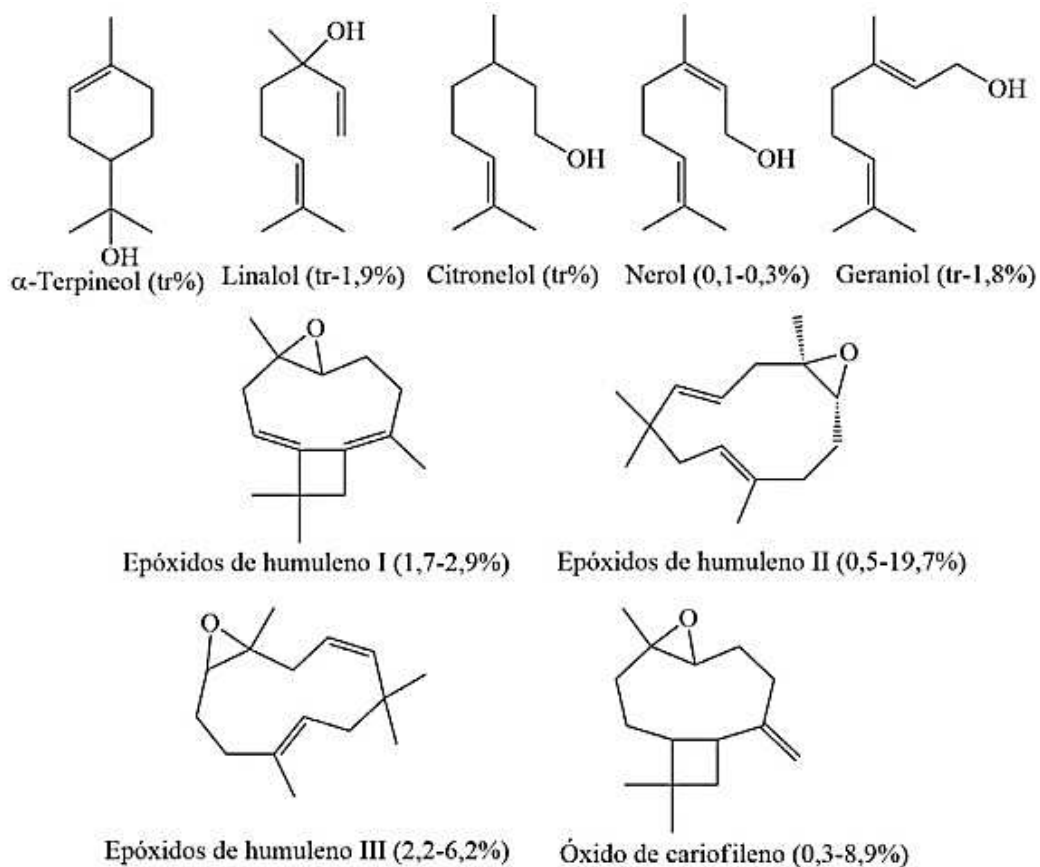


Figura 13 – Principais compostos oxigenados encontrados nos óleos essenciais e suas faixas de concentrações em % m/m reportadas na literatura. **Tr** significa nível traço.

Os compostos sulfurados representam o menor percentual dos óleos essenciais, normalmente caracterizados como *off flavors*, trazendo notas de aroma desagradáveis como de groselha preta e urina de gato, proveniente da 4-mercapto-4-

metilpentan-2-ona (4MMP), ou notas de legumes cozidos, ou de queijo, devido ao S-metil-2-metil-tiobutanoato (KISHIMOTO et al., 2008).

2.1.5. Lúpulo no processo cervejeiro

A produção de cerveja é um processo milenar, seguindo tradicionalmente as seguintes etapas: malteação, mosturação, fervura, clarificação, fermentação, maturação e carbonatação, conforme esquematizado pela Figura 14 (RONNIE WILLAERT, 2007).

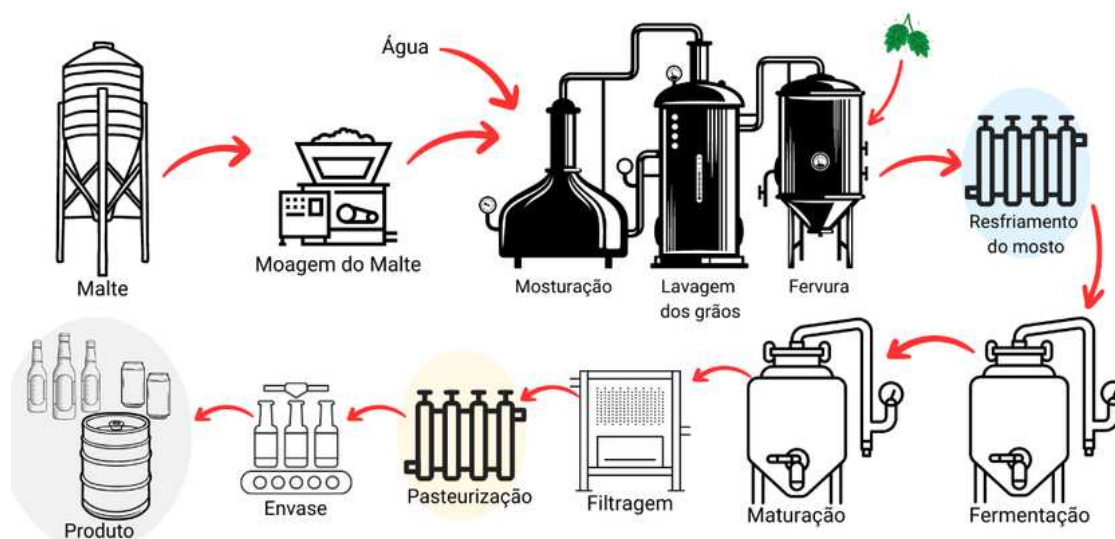


Figura 14 – Fluxograma esquematizando o processo tradicional de fabricação de cerveja.

Explicando de maneira breve, o processo começa com a malteação da cevada, na qual os grãos são germinados para ativar enzimas que convertem o amido em açúcares fermentáveis. Então, após um processo de secagem, o malte é posteriormente moído e misturado com água quente, formando o mosto cervejeiro, durante a etapa de maceração, também chamada de brasagem (ESSLINGER, 2009).

Durante a fervura, o lúpulo é adicionado em diferentes momentos para conferir sabor e aroma à cerveja. O lúpulo adicionado no início da fervura contribui com o amargor, enquanto o lúpulo adicionado nos estágios finais confere notas aromáticas. (VOLLMER; SHELLHAMMER, 2016). Então, o mosto é resfriado e transferido para um tanque de fermentação. Adicionam-se as leveduras para fermentar o mosto, convertendo os açúcares em álcool, dióxido de carbono e compostos aromáticos. (WILLAERT, 2012). Terminada a fermentação, algumas cervejas passam por uma fase de maturação, na qual são armazenadas em temperaturas mais baixas por um período de algumas semanas, desenvolvendo sabores e clarificando a cerveja. Após a fermentação e maturação, a cerveja é carbonatada e engarrafada ou envasada em barris para consumo.

Geralmente, lúpulos com alto teor de α - e β -ácidos, acima de 10%, são classificados como lúpulos de amargor, enquanto lúpulos com baixos teores, porém que apresentam notas sensoriais de interesse, são classificados como lúpulos de aroma. Apesar dessas duas distinções, um mesmo tipo de lúpulo pode apresentar caráter misto, fazendo parte das duas classes, cabendo aos profissionais a escolha da variedade adequada para a receita cervejeira (HEALEY, 2016).

Além da etapa de fervura, o lúpulo pode ser adicionado em outros momentos no processo cervejeiro, quando se deseja intensificar as notas de aromas. Alguns métodos populares como o *dry-hopping* visam adicionar o lúpulo diretamente no fermentador ou no tanque de maturação, realizando-se uma extração a frio por algumas semanas (GOMES et al., 2022).

2.2. Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa é uma das principais técnicas analíticas para identificação e quantificação de substâncias, sendo de uso indispensável na grande maioria dos laboratórios de química analítica (ETTRE, 2000).

Como em qualquer técnica cromatográfica, os analitos interagem com uma fase estacionária, de natureza polar ou apolar, e são arrastados por uma fase móvel de

estado líquido ou gasoso, ao longo da fase estacionária. Compostos diferentes possuem polaridades diferentes, portanto irão apresentar diferentes interações intermoleculares com a fase estacionária e a fase móvel, sendo eluidos com diferentes tempos de retenção. Existem diversos tipos de cromatografia a depender do tipo de fase móvel e estacionária, sendo cada uma aplicada para propósitos distintos, como mostrado na Figura 15 (COLLINS et al., 2006).

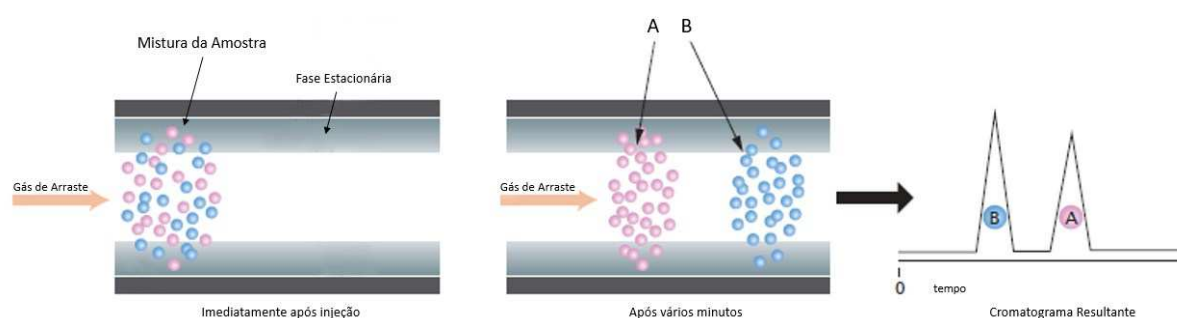


Figura 15 - Esquema de separação de dois analitos A e B ao longo de uma coluna cromatográfica.

Cada técnica cromatográfica possui uma compatibilidade química própria para determinadas características físico-químicas dos compostos químicos. No caso da cromatografia gasosa, a técnica é específica para analitos voláteis, ou derivatizáveis e termicamente estáveis, que não irão se decompor ao longo da análise (BARTLE; MYERS, 2002). Para compostos de natureza não volátil, deve-se usar a cromatografia líquida (ABDU HUSSEN, 2022).

Os analitos introduzidos pelo sistema de injeção são volatilizados e carreados por um gás inerte, sendo os mais comuns: hélio, hidrogênio e nitrogênio, ao longo de uma coluna cromatográfica sob alta temperatura até o detector, conforme esquematizado na Figura 16 (EICEMAN, 2000). Existem diversos tipos de detectores, os quais permitem a obtenção de sinais analíticos das mais variadas classes de compostos orgânicos (ADLARD; JUVET, 1975). Quando os analitos chegam ao detector, no caso um espectrômetro de massas, eles são submetidos a um feixe de

elétrons, formando espécies radicalares devido à perda de elétrons de átomos específicos da molécula. Em virtude da instabilidade criada, as moléculas reagem intramolecularmente, liberando fragmentos moleculares de determinadas razões massa/carga (m/z) que são monitorados pelo equipamento (GLISH; VACHET, 2003).

Como cada composto químico possui um padrão de fragmentação único, cada espectro de massas é exclusivo para cada substância. Por essa razão, a espectrometria de massas é amplamente utilizada para identificação de substâncias presentes em vários tipos de amostras, sendo frequentemente acoplada com outras técnicas analíticas (EL-ANEED; COHEN; BANOUB, 2009).

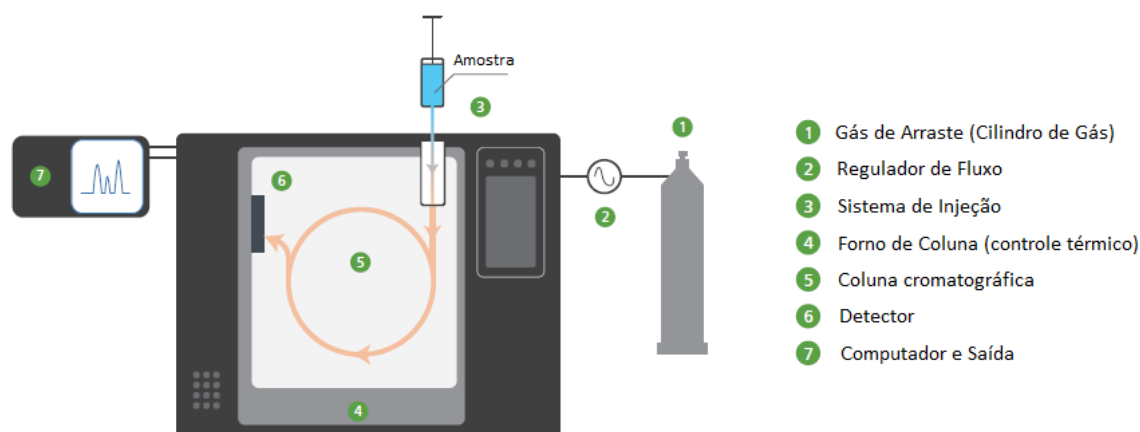


Figura 16 - Esquema instrumental de um equipamento típico de cromatografia gasosa.

2.3. Espectroscopia no infravermelho

A espectroscopia no infravermelho médio é uma técnica analítica importante utilizada em diversas áreas científicas para investigar a composição molecular de substâncias (EWING, 1972). Esta técnica baseia-se na interação entre moléculas e radiação eletromagnética na faixa do infravermelho médio (aproximadamente de 4000 a 400 cm^{-1} ou 2,5 a 25 μm), correspondente a frequências específicas de vibração molecular (HAAS; MIZAIKOFF, 2016).

As moléculas absorvem energia na região do infravermelho médio, resultando em vibrações fundamentais das ligações químicas, rotações e outras mudanças conformacionais. Cada molécula possui um espectro característico que reflete sua estrutura e interações atômicas, permitindo a identificação e análise qualitativa de compostos orgânicos e inorgânicos. Para matrizes razoavelmente complexas, a análise quantitativa a partir desta técnica demanda o uso conjunto de métodos quimiométricos (GRANATO et al., 2018b; KHARBACH et al., 2023; KOWALIK; EINAX, 2006; KUMAR; SHARMA, 2018).

Os espectros no infravermelho médio são obtidos por meio de espectrômetros especializados, os quais empregam fontes de radiação, como lâmpadas de tungstênio, e detectores sensíveis para medir a absorção de energia em diferentes números de onda. A amostra pode ser preparada na forma de pastilhas, filmes finos, líquidos ou gases, e a comparação dos espectros obtidos com bancos de dados referenciais permite a identificação precisa dos compostos (SKOOG, 2009).

O desenvolvimento dos espectrômetros de infravermelho possibilitou o surgimento dos acessórios ATR (*Attenuated Total Reflection*, reflexão total atenuada), oferecendo um grande aumento na versatilidade da técnica, simplificando as medidas que podem ser feitas diretamente em amostras sólidas ou líquidas. Ao utilizar um cristal com índice de refração elevado, o ATR intensifica a reflexão total interna da luz infravermelha, resultando em espectros com maior sensibilidade (MILOSEVIC, 2004).

2.4. Quimiometria

De acordo com Kowalski, um dos pioneiros responsáveis pelo desenvolvimento e difusão deste campo de estudo, “Quimiometria é a disciplina química que usa métodos matemáticos e estatísticos para: (a) planejar ou otimizar procedimentos experimentais; (b) extrair o máximo da informação química relevante, através da análise dos dados; (c) e obter conhecimento sobre sistemas químicos” (KOWALSKI,

1975). Assim, a quimiometria se conceitua como uma ciência interdisciplinar, abrangendo três grandes áreas: matemática, estatística e química.

Como tem-se provado ao longo das décadas, aplicando modelos estatísticos multivariados, a quimiometria desempenha um papel fundamental na interpretação e na extração de informações significativas de conjuntos complexos de dados obtidos pelas mais diversas técnicas analíticas, tais como espectroscopia, cromatografia, análises elementares, dentre outras (DASZYKOWSKI; WALCZAK, 2006; WORKMAN et al., 1996). Visto que a organização e análise de grande volume de dados ocorre não somente na química, mas também em outras áreas da ciência, encontra-se na literatura muitas aplicações de modelos quimiométricos em diversos campos de pesquisa, como biologia molecular, farmacologia, metaboloma, dentre tantos outros exemplos (GRANATO et al., 2018b; KHARBACH et al., 2023; KOWALIK; EINAX, 2006; KUMAR; SHARMA, 2018).

Os modelos quimiométricos utilizados para identificação de padrões podem ser divididos em dois tipos: os modelos “supervisionados”, nos quais informações sobre as amostras são conhecidas e utilizadas na construção do modelo, e os modelos “não-supervisionados”, os quais não requerem nenhum conhecimento prévio a respeito das amostras (LAVINE; WORKMAN, 2013). Esses modelos, quando aplicados em química analítica, podem ter como finalidade análises quantitativas, como na calibração multivariada PLS (*Partial Least Squares*) e PCR (*Principal Component Regression*), ou qualitativas, como na construção de modelos de classificação supervisionada discriminantes, quando são estimados limites no espaço multidimensional para a separação de duas classes a serem previstas, como no caso do PLS-DA (*PLS Discriminant Analysis*), ou de modelagem de uma classe (*one-class*), nos quais apenas a classe alvo é modelada sem levar em conta a informação das outras classes, como no caso do SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*). O SIMCA na verdade é definido como um modelo *one-class*, porque ele modela uma classe sem levar em conta informações das outras. Entretanto, pode-se elaborar vários modelos SIMCA em situações multiclases, de modo que várias classes sejam modeladas (POMERANTSEV; RODIONOVA, 2020).

Visto que os métodos de classificação não-supervisionada são construídos sem a necessidade de atribuir previamente as amostras a determinadas classes, eles são também denominados “análise exploratória dos dados”, sendo os modelos mais famosos a PCA (*Principal Component Analysis*) e a HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*) (GRANATO et al., 2018a). Muitos autores defendem que os métodos não-supervisionados são mais adequados para as abordagens classificatórias em relação aos métodos supervisionados, pois nesse caso as amostras são agrupadas naturalmente com base apenas nos dados experimentais fornecidos (RODIONOVA; TITOVA; POMERANTSEV, 2016).

2.4.1. PCA

A Análise de Componentes Principais, PCA, é empregada para reduzir a complexidade de conjuntos de dados multidimensionais, buscando-se identificar padrões, relações e estruturas nos dados, permitindo uma visualização mais clara e uma compreensão mais simplificada das variáveis envolvidas (ENGEL; BUYDENS; BLANCHET, 2017).

O funcionamento da PCA baseia-se na transformação dos dados originais, compostos por múltiplas variáveis correlacionadas, em um novo conjunto de variáveis não correlacionadas chamadas de componentes principais (CP). Essas novas variáveis são geradas de modo a capturar a maior variância da informação contida nos dados, com a primeira componente principal capturando a maior quantidade possível de variação dos dados. As subsequentes componentes principais são ortogonais entre si, portanto independentes, e capturam a variância remanescente, em ordem decrescente de importância (BRO; SMILDE, 2014).

Antes de se aplicar a PCA, inicialmente o conjunto de dados é organizado em uma matriz \mathbf{X} ($I \times J$), geralmente os dados são pré-processados, visando eliminar variância indesejada. O procedimento da PCA pode ser descrito como a decomposição da matriz \mathbf{X} em duas matrizes, sendo uma de escores \mathbf{T} e uma matriz ortonormal de pesos \mathbf{L} , em inglês chamados de *loadings*, conforme a equação 1.

$$\mathbf{X} = \mathbf{T} \mathbf{L}^T \quad (1)$$

Nesse contexto, os escores expressam as relações entre as amostras, enquanto os *loadings* indicam as relações entre as variáveis. Uma vez definidos os novos eixos das componentes principais, cada amostra é projetada no novo sistema, podendo-se encontrar essa informação na matriz de escores (FERREIRA, 2015).

Há várias formas descritas na literatura para o cálculo das matrizes de escores e de *loadings*, sendo o método de Decomposição por Valores Singulares (*Singular Value Decomposition* – SVD) um dos mais utilizados na química, por apresentar maior acurácia e estabilidade no cálculo das componentes principais (BRO; ACAR; KOLDA, 2008) Nesse método, a matriz de dados \mathbf{X} é decomposta em três matrizes \mathbf{U} , \mathbf{S} e \mathbf{V} , descritas na equação 2. Assim, o produto $\mathbf{U} \mathbf{S}$ (I x J) corresponde à matriz de escores \mathbf{T} , enquanto \mathbf{V} corresponde à matriz de *loadings* \mathbf{L} .

$$\mathbf{X} = \mathbf{U} \mathbf{S} \mathbf{V}^T \quad (2)$$

Dessa forma, as componentes principais permitem representar os dados de forma mais compacta, mantendo a maior parte da informação contida nos dados originais. Isso facilita a identificação de padrões, a detecção de tendências e a redução da dimensionalidade dos dados, o que é especialmente útil quando se lida com conjuntos de dados volumosos ou quando se deseja visualizar a estrutura latente subjacente aos dados sem perder informações relevantes, permitindo observar agrupamentos naturais (BRO; SMILDE, 2014).

2.4.2. HCA

A Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) é uma técnica estatística empregada na quimiometria e em diversas outras áreas para explorar a estrutura de conjuntos de dados, identificando padrões e agrupamentos naturais entre as observações, baseando-se nas distâncias das amostras no espaço multidimensional. Ela é amplamente utilizada para a análise de similaridades e diferenças entre objetos ou amostras, agrupando-os com base em suas características (KUMAR et al., 2014).

Diferentemente da PCA, o funcionamento da HCA envolve a construção de uma estrutura hierárquica de agrupamentos, na qual os objetos são unidos ou divididos sucessivamente com base em sua proximidade ou similaridade (GRANATO et al., 2018). Existem duas abordagens principais na HCA: a aglomerativa e a divisiva. Na abordagem aglomerativa, cada observação é inicialmente considerada um único agrupamento (*cluster*). Em seguida, os agrupamentos mais similares são mesclados iterativamente, formando agrupamentos maiores, até que todas as observações façam parte de um único *cluster*. Esse processo é representado por um dendrograma, um gráfico que mostra a ordem em que as observações foram agrupadas. Por outro lado, na abordagem divisiva, menos comum, todas as observações começam como parte de um único grande cluster, e o algoritmo sucessivamente os divide em *clusters* menores, criando uma estrutura hierárquica de divisão.

Como a HCA é predominantemente usada como uma técnica aglomerativa, assume-se *a priori* que cada amostra representa um grupo isolado e que as amostras próximas entre si no espaço multidimensional são semelhantes. Para a elaboração do modelo, inicialmente define-se um índice numérico para medir a distância entre pares de amostras, sendo as mais comuns dadas pela distância Euclidiana, distância de Manhattan e distância de Mahalanobis (FERREIRA, 2015). Quando a HCA é usada diretamente nos dados, a distância Euclidiana é quase sempre a opção mais utilizada. Por outro lado, a distância de Mahalanobis, que é adimensional e invariante em relação à escala das variáveis medidas, é preferida quando se aplica a HCA nos escores de um modelo PCA (TODESCHINI; BALLABIO; CONSONNI, 2015).

Após, a seleção do critério de distância, define-se um método de agrupamento entre pares/grupos de amostras mais próximas entre si, repetindo-se esse processo sucessivamente para todas as amostras no espaço multidimensional. Existem diversos métodos de agrupamentos reportados na literatura, sendo o método de Ward um dos mais populares (WARD, 1963).

A HCA é especialmente útil quando se deseja identificar a estrutura subjacente dos dados, revelando padrões de similaridade ou dissimilaridade entre as observações. Essa técnica é aplicada em várias áreas, como biologia, química, e ciência de dados, possibilitando a identificação de grupos naturais de amostras com características semelhantes (KUMAR; SHARMA, 2018).

2.4.3. PLS

A regressão por Mínimos Quadrados Parciais, PLS, é uma técnica estatística empregada na quimiometria e em outras áreas para modelar quantitativamente a relação entre variáveis independentes e dependentes, especialmente quando há multicolinearidade ou alta dimensionalidade nos dados (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001). Essa abordagem é valiosa quando se deseja prever uma variável de resposta, geralmente a concentração de determinado analito, ou uma propriedade, com base em um conjunto de variáveis independentes altamente correlacionadas, normalmente conjuntos espectrais, sendo aplicada em situações em que não é possível elaborar curvas de calibração univariadas (KUMAR, 2021).

O processo de construção do modelo PLS é iterativo e funciona pela estimativa de novos conjuntos de variáveis, chamados de variáveis latentes (VL), que são vetores não-ortogonais no espaço multidimensional, proveniente de combinações lineares das variáveis originais, diferentemente do que ocorre nas componentes principais, que são ortogonais. As VL são calculadas de modo a capturar a maior quantidade possível de informação simultaneamente das variáveis independentes e dependentes. Na regressão em componentes principais (PCR), os dados das variáveis independentes (bloco X, variáveis espectrais) são decompostos em componentes principais e, na

sequência, é feita uma regressão linear múltipla entre os escores e as variáveis dependentes a serem previstas (bloco Y) (ERIKSSON; TRYGG; WOLD, 2014). No PLS, a etapa de decomposição dos dados é feita simultaneamente nos blocos X e Y, e por isso há perda de ortogonalidade, e daí a denominação VL. O fato de a decomposição dos dados levar em conta também as informações das variáveis a serem previstas, além dos espectros, é uma suposta vantagem do PLS sobre o PCR, o que levou a maior popularidade do primeiro método (GODOY; VEGA; MARCHETTI, 2014). Matematicamente, a base estrutural do modelo PLS pode ser descrito de acordo com as equações 3 e 4:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}' + \mathbf{E} \quad (3)$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}' + \mathbf{F} \quad (4)$$

Sendo \mathbf{X} a matriz de dados espectrais, \mathbf{Y} a matriz de variáveis dependentes a serem previstas (no caso de uma única variável, \mathbf{y} é um vetor), \mathbf{T} e \mathbf{P} são os escores das matrizes \mathbf{X} e \mathbf{Y} , respectivamente; \mathbf{P} e \mathbf{Q} são as respectivas matrizes de *loadings*; e \mathbf{E} e \mathbf{F} as respectivas matrizes de resíduos.

Ao contrário dos métodos de regressão convencionais, a PLS é especialmente útil quando há multicolinearidade entre as variáveis independentes ou quando o número de variáveis é maior do que o número de observações, superando as limitações da regressão linear múltipla (FERREIRA, 2015). Ela é amplamente utilizada em várias áreas, incluindo química, biologia, engenharia e ciência de dados, fornecendo uma maneira eficaz de modelar relacionamentos complexos entre variáveis e prever resultados com exatidão e robustez em conjuntos de dados representativos (WOLD; SJÖSTRÖM; ERIKSSON, 2001). Na química analítica, o PLS é comumente utilizado como modelo de calibração para quantificação de analitos, através da simples aquisição espectral direta das amostras. Como em muitas técnicas espectroscópicas é necessário pouco, ou nenhum preparo de amostra, além de os dados espectrais serem obtidos de maneira rápida, os modelos quimiométricos

quantitativos oferecem várias vantagens, como maior praticidade, ausência de longos procedimentos experimentais, sem necessidade de se usar solventes ou reagentes tóxicos, o que reduz o descarte de resíduos químicos e está em conformidade com os princípios da química verde. Desta forma, a frequência analítica é muito maior do que nos métodos quantitativos univariados convencionais, tornando a análise multivariada propícia para controle de qualidade de diversas matrizes, principalmente em situações de grandes demandas analíticas.(HE et al., 2007).

Poucos trabalhos foram reportados na literatura sobre modelos quimiométricos em pellets de lúpulo, ou em seus óleos essenciais. A grande maioria das pesquisas tratam sobre modelos de autenticidade e discriminação de amostras entre diferentes tipos de lúpulo, ou de lúpulos provenientes de regiões distintas. (DUARTE et al., 2020; HONG et al., 2022; KOVAČEVIČ; KAČ, 2002; MACHADO et al., 2018; MARTINS et al., 2020; OCVIRK; NEČEMER; KOŠIR, 2019; PEPI et al., 2019). Até o presente momento, não foram encontrados trabalhos sobre modelos quantitativos em óleos essenciais de lúpulo.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Extração dos óleos essenciais

As amostras foram adquiridas em diferentes lojas cervejeiras nacionais. A extração dos óleos essenciais foi realizada conforme o método oficial da ASBC (hop-13), utilizando um sistema Clevenger (Vidrolabor[®]), apresentado na Figura 17 (ASBC, 2011). Foram adicionados cerca de 95 gramas de lúpulos em *pellet* T90 e 1 L de água potável, mantendo o sistema em destilação por aproximadamente 4 horas. O método de referência sugere 100 gramas para 1 litro, entretanto neste trabalho optou-se por utilizar um valor menor, visando-se guardar uma pequena quantidade de amostra para análises posteriores. Após a leitura do volume da extração, fez-se uma conversão para 100 gramas.

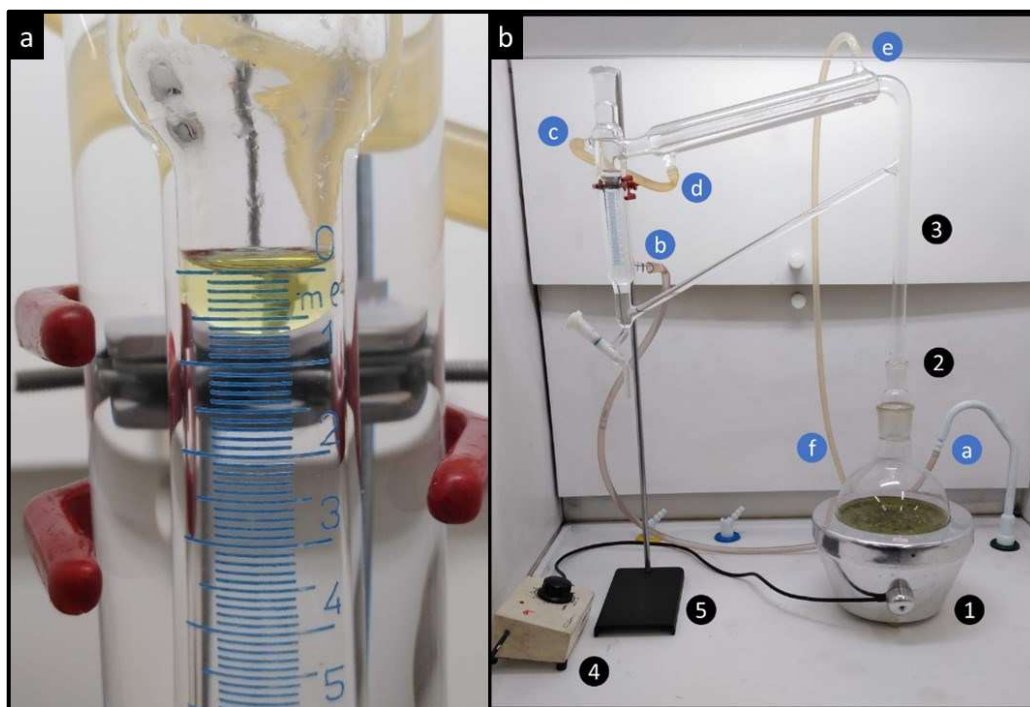


Figura 17 - (a) Imagem indicando o volume de óleo essencial extraído, observando-se uma leitura de 0,7 mL. (b) Sistema de extração de Clevenger. Fotos de autoria própria.

Inicialmente, montou-se o sistema de acordo com a Figura 17b, constituído por: (1) manta de aquecimento com o balão de destilação de 2 L, (2) adaptador de boca larga, (3) sistema de extração de Clevenger, (4) regulador de temperatura da manta, (5) suporte universal, O caminho da água do condensador está representado na sequência a-b-c-d-e-f, indicada na figura, conectando-se três mangueiras de silicone nos segmentos 'ab', 'cd' e 'ef'. Não é possível observar na imagem, mas no local de trabalho havia uma pia atrás do balão de destilação, na qual a ponta de saída da mangueira foi depositada. Como em qualquer vidraria de extração ou destilação, esta água flui externamente, não entrando em contato com o sistema interno. Antes do início da destilação, foi adicionado cerca de 50 mL de água por cima do tubo graduado à esquerda, de modo que o óleo essencial não se depositasse na sua parte inferior, na região da torneira de recolhimento da amostra.

O sistema de extração de Clevenger é bem simples, consistindo basicamente em um sistema de destilação cíclico. Aqueceu-se a amostra no balão até a ebulição e, com isso, o vapor se condensou e escoou até a região graduada do sistema à esquerda. O óleo essencial, por ser menos denso, aloca-se na parte superior do tubo e a água na fase inferior. Com o passar do tempo, a água retorna ao balão através do tubo de retorno, que conecta a parte inferior do tubo graduado com a parte à direita do sistema, sendo conseqüentemente aquecida, reiniciando o ciclo.

Após 4 horas de destilação, o volume de óleo extraído não aumentou significativamente, então, desenroscou-se a torneira da parte esquerda, deixando-se passar um pouco de água até que o menisco superior do óleo ficasse tangente ao marco zero da graduação. Interrompeu-se o fluxo e realizou-se a leitura do volume de óleo extraído, conforme ilustrado na Figura 17a. Então, deixou-se a água e o óleo essencial escoarem lentamente, coletando a amostra. Todos os óleos foram coletados em frascos de polycarbonato, vedados com *batoques* e armazenados em geladeira sob temperatura entre 1 e 4 °C, de modo a evitar uma possível polimerização do β -mirceno (RUNCKEL; GOLDBLATT, 1946)

3.2. Espectroscopia no infravermelho médio

As análises no IR-médio foram realizadas, pipetando-se 10 μL de óleo essencial, sem diluição, e depositando-se diretamente sobre o cristal de diamante do acessório ATR, no espectrômetro Perkin Elmer®, modelo Frontier Single Range – MIR e detector de LiTaO_3 . (Figura 18). A faixa espectral abrangeu a região de 4000 a 650 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , fazendo-se 16 varreduras por espectro.



Figura 18 - Espectrômetro Perkin Elmer®, modelo Frontier Single Range.

3.3. Análise cromatográfica

Elaborou-se uma curva analítica em balões volumétricos de 5,00 mL com as concentrações de 0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50 e 1,75% v/v, utilizando β -mirceno (Sigma-Aldrich®, grau FG, CAS: 123-35-3) como padrão e n-hexano (SupraSolv®, hipergrau para análise de traços orgânicos, CAS: 110-54-3) como solvente. Em um balão volumétrico de 25,00 mL, preparou-se uma solução de padrão interno de 1-octanol 1% v/v (Sigma-Aldrich®, anidro, $\geq 99\%$, CAS: 111-87-5) também em n-hexano. Essa faixa de concentrações foi utilizada para a validação do método cromatográfico.

Entretanto, durante a quantificação das amostras, utilizou-se uma curva de trabalho reduzida com as soluções padrões de 0,50; 1,00 e 1,50% v/v. Então, em triplicata, pipetou-se 50 μL da solução padrão em vials cromatográficos de 2 mL (Analítica®, vidro borossilicato), adicionou-se 50 μL da solução de padrão interno, completou-se o volume para 1,00 mL com n-hexano e levou-se os vials para o equipamento GC-MS QP2010 Plus Shimadzu® acoplado a um analisador monoquadrupolo, conforme indicado na Figura 19. A solução branco foi preparada, substituindo o volume de 50 μL de solução padrão por n-hexano.



Figura 19 - Equipamento GC-MS QP2010 Plus Shimadzu®.

Em relação às amostras, inicialmente realizou-se uma diluição de 50 vezes, pipetando-se 20 μL de óleo essencial em tubos eppendorf de 2 mL, completando-se o volume para 1,00 mL com n-hexano. Na maioria das amostras essa diluição foi suficiente para que a concentração calculada ficasse dentro da faixa linear da curva analítica, porém para algumas foi necessário ajustar o fator de diluição, principalmente para as amostras de baixa concentração de mirceno. Após essa diluição, seguiu-se o mesmo preparo das soluções padrões, pipetando-se 50 μL da amostra diluída e 50 μL de padrão interno em *vials* cromatográficos de 2 mL. As condições cromatográficas estão descritas no Quadro 2.

Quadro 1 - Condições instrumentais aplicadas nas quantificações dos óleos essenciais extraídos do lúpulo

Cromatografia Gasosa	
Coluna cromatográfica	RTX-5 (30m x 0,25mm x 0,25 µm)
Temperatura da Injeção	260 °C
Modo de injeção	Split (10)
	T. Inicial: 85 °C, manter por 7 min
Rampa de Temperatura	Taxa: 15°C/min
	T. Final: 270°C, manter por 0 min
Tempo total	19,33 min
Gás de arraste	Hélio
Modo de controle de fluxo	Velocidade linear
Pressão	90,2 kPa
Fluxo total	15,9 mL/min
Fluxo da coluna	1,17 ml/min
Velocidade linear	40,0 cm/s
Fluxo da purga	3,0 mL/min
Espectrometria de Massas	
Temperatura da Fonte	200 °C
Temperatura da Interface	250 °C
Tempo inicial	3 min
Tempo final	7 min
Modo de Detecção	<i>Full scan</i>
Faixa de Detecção	40,0 – 500,0 (<i>m/z</i>)

3.4. Construção dos modelos quimiométricos

A elaboração dos modelos quimiométricos e o tratamento dos dados foram realizadas utilizando o *software* MATLAB® 2010 e o pacote PLS_Toolbox, versão 5.2.2. Inicialmente, 54 espectros no IR-médio foram organizados em uma matriz (54 x 1676), na qual as linhas correspondem às amostras e as colunas aos valores de transmitância obtidos para cada número de onda (cm^{-1}). Esses dados foram convertidos para absorvância, aplicando-se a relação $A = -\log(T)$. Para a elaboração do modelo PLS, utilizou-se o algoritmo de Kennard-Stone, de modo a se fazer uma distribuição homogênea e representativa das amostras entre os conjuntos de treinamento e teste, mantendo-se 2/3 das amostras no conjunto de calibração e 1/3 no conjunto validação, totalizando 36 e 18 amostras, respectivamente (KENNARD; STONE, 1969). Os modelos quimiométricos, PCA e HCA, foram elaborados a partir da mesma matriz (54x1676) sem a aplicação de algoritmos de distribuição de amostras entre os conjuntos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Óleos essenciais

As informações referentes às safras dos lúpulos, variedade, volume da extração dos óleos essenciais e concentração de mirceno determinada do método de referência estão indicados na Tabela A1 em Apêndice – Informações Referentes às Amostras (ASBC, 2011). Todos os óleos extraídos apresentaram o mesmo aspecto sensorial: coloração amarelo claro, sendo alguns em um tom mais intenso, e todos com um aroma herbal e gramíneo, sendo alguns com notas cítricas.

No total, fez-se a extração de aproximadamente 85 amostras de variedades de lúpulo, entretanto muitas delas apresentaram concentração de β -mirceno inferior ao limite de quantificação do método e foram descartadas no trabalho. Na Tabela A1 estão indicadas as 54 amostras usadas na elaboração dos modelos PCA, HCA e PLS. Como se pode observar, algumas variedades aparecem repetidamente na tabela, porém como foram adquiridas por diferentes fornecedores, foram consideradas como amostras distintas e independentes.

Ao todo, analisou-se 19 lúpulos provenientes dos EUA, 13 da Alemanha, 8 do Brasil, 3 da República Tcheca, 3 da Inglaterra e 2 de cada um dos seguintes países: Austrália, Nova Zelândia, Eslovênia e França. Assim como mencionado na revisão bibliográfica, os países com menores números de amostras na tabela possuem poucas variedades de lúpulo patenteadas no mercado, o que justifica o predomínio dos lúpulos americanos e alemães neste trabalho. Importante ressaltar que os lúpulos brasileiros analisados não foram geneticamente patenteados no Brasil e correspondem a lúpulos de mudas estrangeiras cultivados em solo brasileiro. A fim de se visualizar melhor os dados, elaborou-se histogramas sobre as frequências dos volumes das extrações e a concentração de mirceno, indicados nas Figuras 20 e 21, respectivamente.

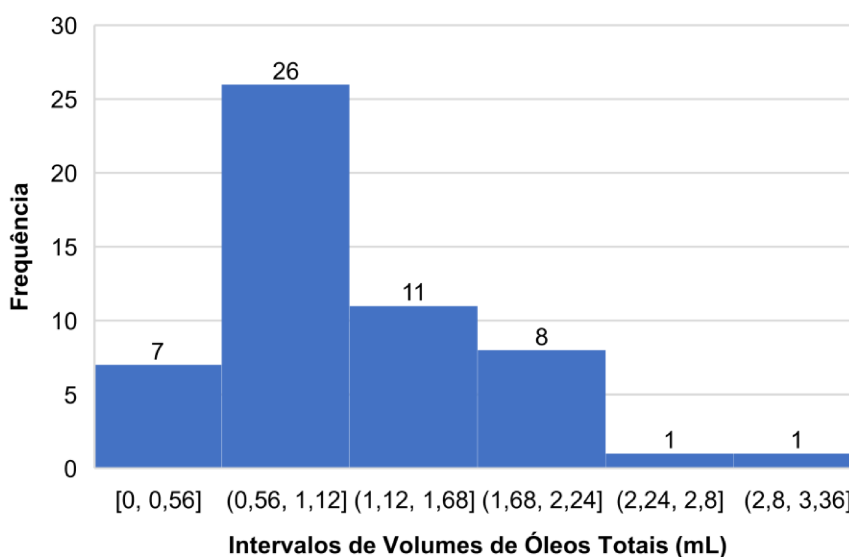


Figura 20 - Histograma dos volumes de óleos essenciais. Parênteses significa que o valor não está incluso no intervalo. Colchete significa que o valor está incluso. Exemplo: (0,56, 1,12] significa maior que 0,56 e menor ou igual a 1,12.

Pode-se inferir através do histograma da Figura 20, que visualmente o conjunto de dados segue a distribuição normal e que o volume da extração de óleos essenciais foi baixo para a maioria das amostras, como se pode constatar pelo maior número de amostras presentes nas duas primeiras faixas de intervalo, entre 0,00 e 1,12 mL. Tal resultado, como esperado, pode ser justificado pelo tempo decorrido entre a peletização da amostra e a extração. É difícil encontrar safras de lúpulo recentes no mercado, portanto procurou-se comprar pacotes de lúpulo com no máximo 2 anos de diferença em relação às datas das extrações. Devido à alta volatilidade dos óleos essenciais, com o passar dos anos o volume total das extrações tende a reduzir, mesmo considerando que os pacotes sejam armazenados adequadamente sob refrigeração. Portanto, os volumes de óleos totais determinados não devem ser considerados como valores de referência para as variedades, visto que as extrações nem sempre foram realizadas no mesmo ano de colheita das safras.

Na Figura 21, nota-se um tipo de histograma assimétrico com perfil decrescente. Segundo a literatura, o β -mirceno pode se auto-oxidar em compostos como α -pineno, β -pineno, linalol, geraniol, geranial, e neral, quando os lúpulos forem armazenados

inadequadamente (RUNCKEL; GOLDBLATT, 1946). Apesar de todos os cuidados terem sido tomados, o histograma pode sugerir um indício de transformação do β -mirceno durante o armazenamento, visto que o perfil da Figura 20 seguiu uma distribuição normal. No entanto, isso não foi um empecilho para o trabalho, porque apesar de muitas vezes a concentração de mirceno ter sido inferior à faixa reportada na literatura, a aquisição espectral foi feita em datas próximas às extrações.

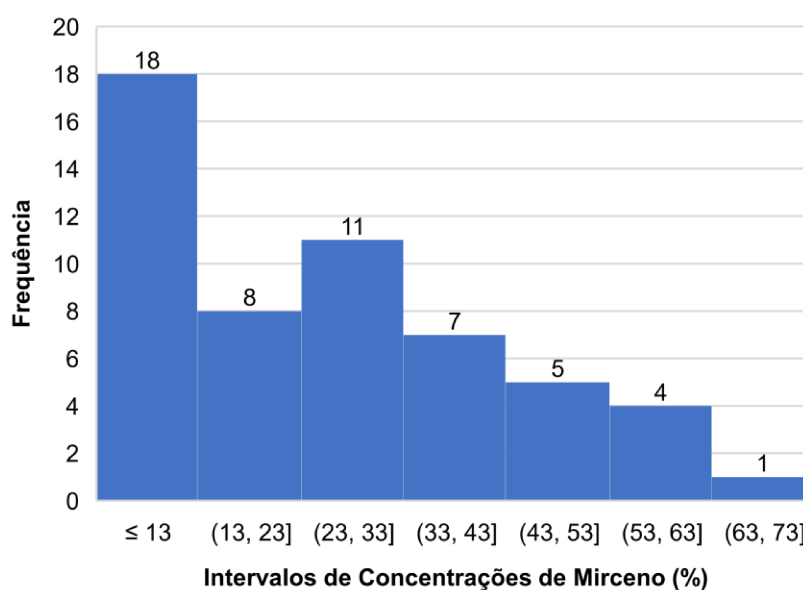


Figura 21 - Histograma sobre as concentrações de mirceno. Parênteses significa que o valor não está incluso no intervalo. Colchete significa que o valor está incluso. Exemplo: (13, 23] significa maior que 13 e menor ou igual a 23.

4.2. Análise cromatográfica

Um cromatograma de uma das amostras de óleo essencial, tomado como exemplo é mostrado na Figura 22. Nota-se poucos picos cromatográficos na figura, porque a metodologia foi elaborada com um alto fator de diluição, visando a quantificação apenas do β -mirceno, reduzindo-se a interferência dos outros constituintes dos óleos essenciais.

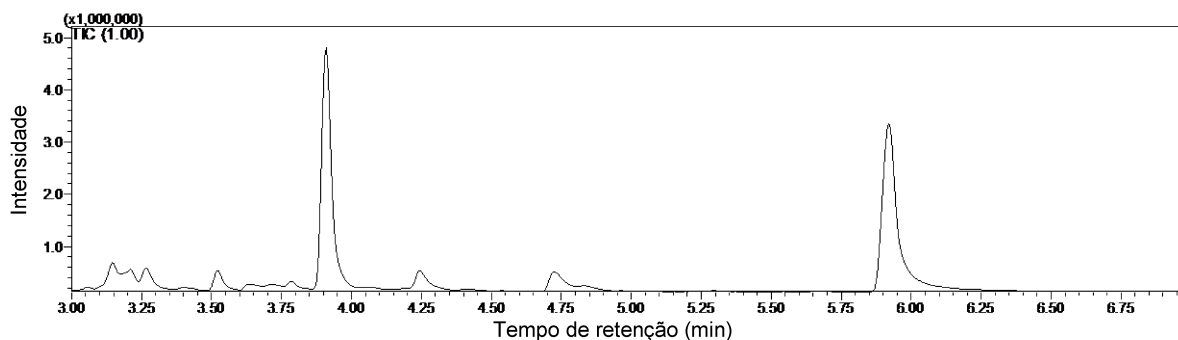


Figura 22 – Cromatograma típico para uma amostra de óleo essencial, contendo o padrão interno 1-octanol.

O tempo de retenção do β -mirceno foi determinado como 3,90 min, enquanto o do 1-octanol, usado como padrão interno, foi de 5,90 min. Notam-se outros sinais de baixa intensidade no cromatograma, provenientes do padrão comercial do β -mirceno, confirmado pelo branco de amostra. As injeções foram realizadas no modo TIC (*Total Ion Current*), entretanto para a quantificação utilizou-se o íon de m/z 41 para o β -mirceno e o íon de m/z 56 para o 1-octanol. Na Figura 23, observa-se o espectro de massas identificado para os dois compostos em seus respectivos tempos de retenção.

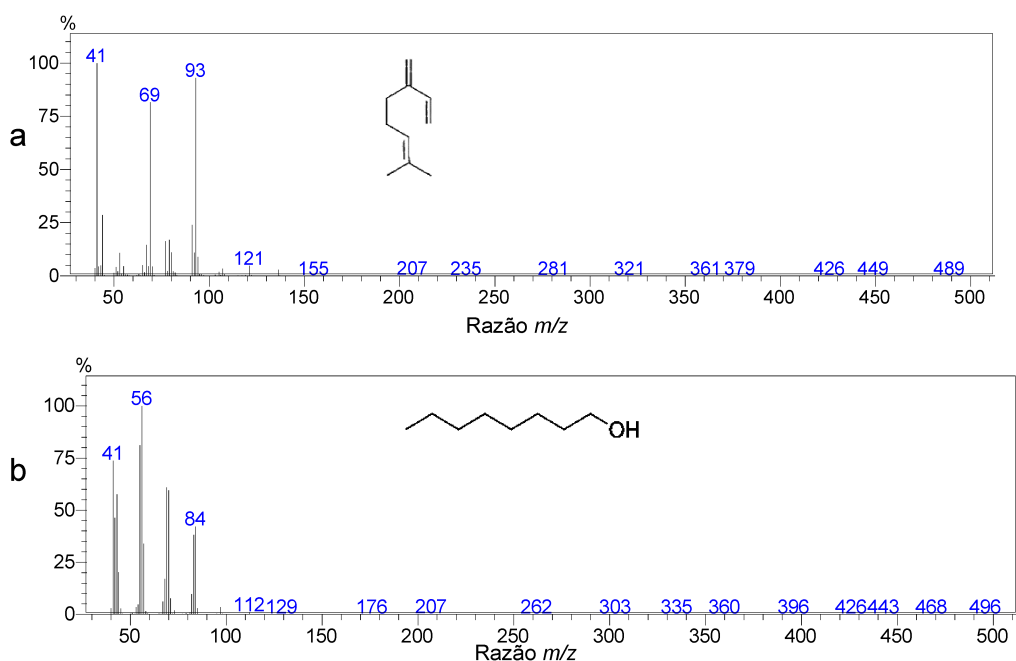


Figura 23 - Espectro de massas para o (a) β -mirceno e o (b) 1-octanol.

4.3. Validação do método cromatográfico

A fim de se checar a confiabilidade do método cromatográfico, realizou-se uma validação analítica, avaliando-se a linearidade, reprodutibilidade e exatidão do método, seguindo o guia da ISO 17025 (ABNT, 2017). Os resultados serão discutidos em mais detalhes nos tópicos seguintes.

4.3.1. Linearidade

Para a avaliação da linearidade realizaram-se testes de normalidade, homoscedasticidade e autocorrelação dos resíduos, nesta sequência, bem como aplicou-se a ANOVA (Análise de Variância) para os testes de significância estatística e falta de ajuste da regressão (SOUZA, 2005).

O teste de linearidade foi realizado preparando-se, em triplicata, uma curva de calibração nos pontos 0,75, 0,90, 1,00, 1,25, 1,50 e 1,75% v/v, conforme a metodologia descrita na seção 3.3. Realizou-se o teste de resíduos padronizados de Jacknife (HARDY et al., 1996), com o qual foram identificadas duas amostras anômalas (*outliers*) na curva de calibração, ambos de dois padrões em 1,75% v/v. Após a remoção desses dois pontos, ajustou-se o modelo linear como indicado na Figura 24, obtendo-se um coeficiente de determinação $R^2 = 0,9928$. De acordo com os guias de validação, o limite para remoção de *outliers* é de até 3 pontos da curva de calibração, portanto não houve nenhum problema na remoção efetuada, pois todos os testes estatísticos para avaliar a linearidade do método demonstraram conformidade (ABNT, 2017).

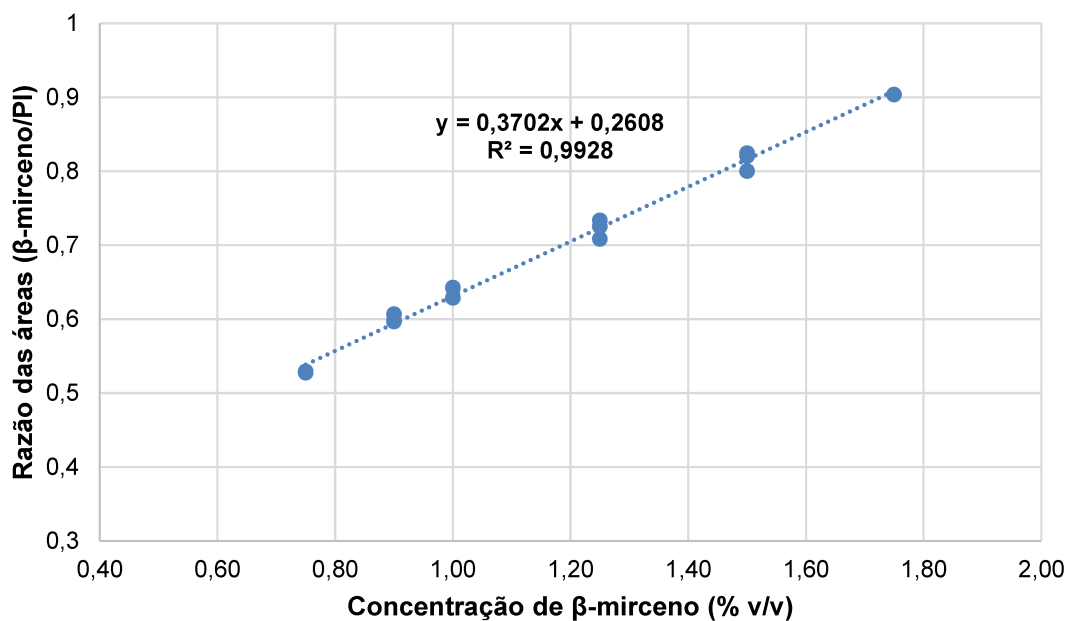


Figura 24 - Regressão linear para o ajuste do método cromatográfico.

Os valores das respostas das concentrações, erros quadráticos e resíduos estimados por ANOVA estão indicados na Tabela 2. Baseado nos valores da Tabela 2, utilizou-se a ANOVA, teste F, para avaliação da significância e da falta de ajuste da regressão linear.

Tabela 2 - ANOVA Curva de Calibração

FV	GL	SQ	QM ou s2	F	F_{crit}
Regressão	1	2.03E-01	2.03E-01	1940.08	4.600
Resíduo	13	1.46E-03	1.05E-04		
Desvio da linearidade	4	6.15E-04	1.54E-04	1.814	3.478
Ent.Níveis	5	2.03E-01			
Erro puro	10	8.48E-04	8.48E-05		
Total	14	2.04E-01			

FV: fonte de variação. **GL:** graus de liberdade. **SQ:** soma quadrática.
MQ: média quadrática. **F_{crit}:** F crítico

Visto que foram removidos dois *outliers*, o número de graus de liberdade para as fontes de variação foi alterado para 14. Realizou-se o teste F a 95% de confiança para a significância da regressão, e o valor calculado de F foi 1940,08, muito maior do que o valor tabelado de 4,600. Portanto, rejeitou-se a hipótese nula, constatando-se de que a regressão linear é significativa. Para o teste de falta de ajuste, o valor de F foi 1,814, menor do que do que o F crítico, aceitando-se a hipótese de que a falta de ajuste não foi significativa. Constatou-se ainda que a regressão linear segue a distribuição normal, através do teste de Ryan-Joiner, e que as variâncias dos resíduos são homoscedásticas, pelo teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado. Não houve autocorrelação entre os resíduos, o que foi constatado pelo teste de Durbin-Watson (SOUZA, 2007). Os parâmetros estimados para a realização destes testes são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resumo dos parâmetros dos testes estatísticos para avaliar a linearidade do método cromatográfico.

	Parâmetro Estatístico	Valor do parâmetro
n		16
Equação		$y = 0,3702x + 0,2608$
Normalidade	R^2	0,9928
	R_{eq}	0,9693
Homoscedasticidade	p	>0,10
	t_L	-0,118
Independência	p	0,9076
	d	>0,10
Regressão	d	1,854
	p	>0,05
Falta de ajuste	F	1940
	p	$2,04 \times 10^{-16}$
	F	1,814
	p	0,203

R^2 , coeficiente de determinação; R_{eq} , parâmetro para avaliação da distribuição normal dos resíduos no teste de Ryan-Joiner; t_L , parâmetro para avaliação de homoscedasticidade no teste de Brown-Forsythe; d, parâmetro para avaliação da ausência de autocorrelação dos resíduos no teste de Durbin-Watson; F, valor do teste F para ANOVA; p, valor p.

4.3.2. Estimativa do LQ e LD

Para a determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), preparou-se 10 soluções do branco, conforme a metodologia descrita na seção 3.3 e tomou-se o desvio-padrão das razões entre a área referente ao tempo de retenção do β -mirceno pela área do padrão interno. As fórmulas para o cálculo do LOD e LOQ,

estão indicadas nas Equações (5) e (6), de modo que **s** representa o desvio padrão e **m** representa o coeficiente angular da curva de calibração.

$$LOD = 3 \frac{s}{m} \quad (5)$$

$$LOQ = 10 \frac{s}{m} \quad (6)$$

Naturalmente, a solução do branco apresentou baixíssimo sinal analítico nesse tempo de retenção. Entretanto, isso não configurou um problema por se tratar de uma situação usual em análises cromatográficas, que ocorre devido às oscilações da linha de base. O desvio padrão obtido para as 10 soluções do branco foi de $2,2 \times 10^{-3}$, logo o LD foi estimado como 0,02% v/v e o LQ como 0,06% v/v.

4.3.3. Precisão intra-dia

Para a determinação da precisão intermediária, realizou-se, em sextuplicata, análises das soluções padrões de 0,90; 1,15 e 1,40 % v/v em três dias consecutivos. Calculou-se a recuperação média em cada nível e verificou-se que os resultados se encontram dentre os limites mínimos e máximos de 80 a 120%, respectivamente. Encontrou-se poucos outliers e para todos os níveis de concentração durante os três dias, os resultados estiveram em conformidade com os testes estatísticos da ISO17025, encontrando-se desvios padrões relativos entre 2 e 4% (ABNT, 2017).

4.4. Modelos Quimiométricos

4.4.1. PCA

Inicialmente, fez-se uma análise exploratória do conjunto de dados através de um modelo PCA. Os pré-processamentos testados foram SNV (*Standard normal variate*), MSC (*Multiplicative scatter correction*), primeira e segunda derivadas. Nos modelos PCA, a melhor discriminação de agrupamentos foi observada utilizando a primeira derivada com alisamento de Savitzky-Golay (filtro de 7 pontos, polinômio de segunda ordem), seguida de centrar na média. A primeira derivada representa uma escolha adequada como pré-processamento de dados contínuos, porque permite corrigir o desvio de linha base dos espectros e geralmente intensifica o perfil de bandas de baixa magnitude. Os espectros no IR-médio no modo de absorbância para as 54 amostras estão mostrados na Figura 25.

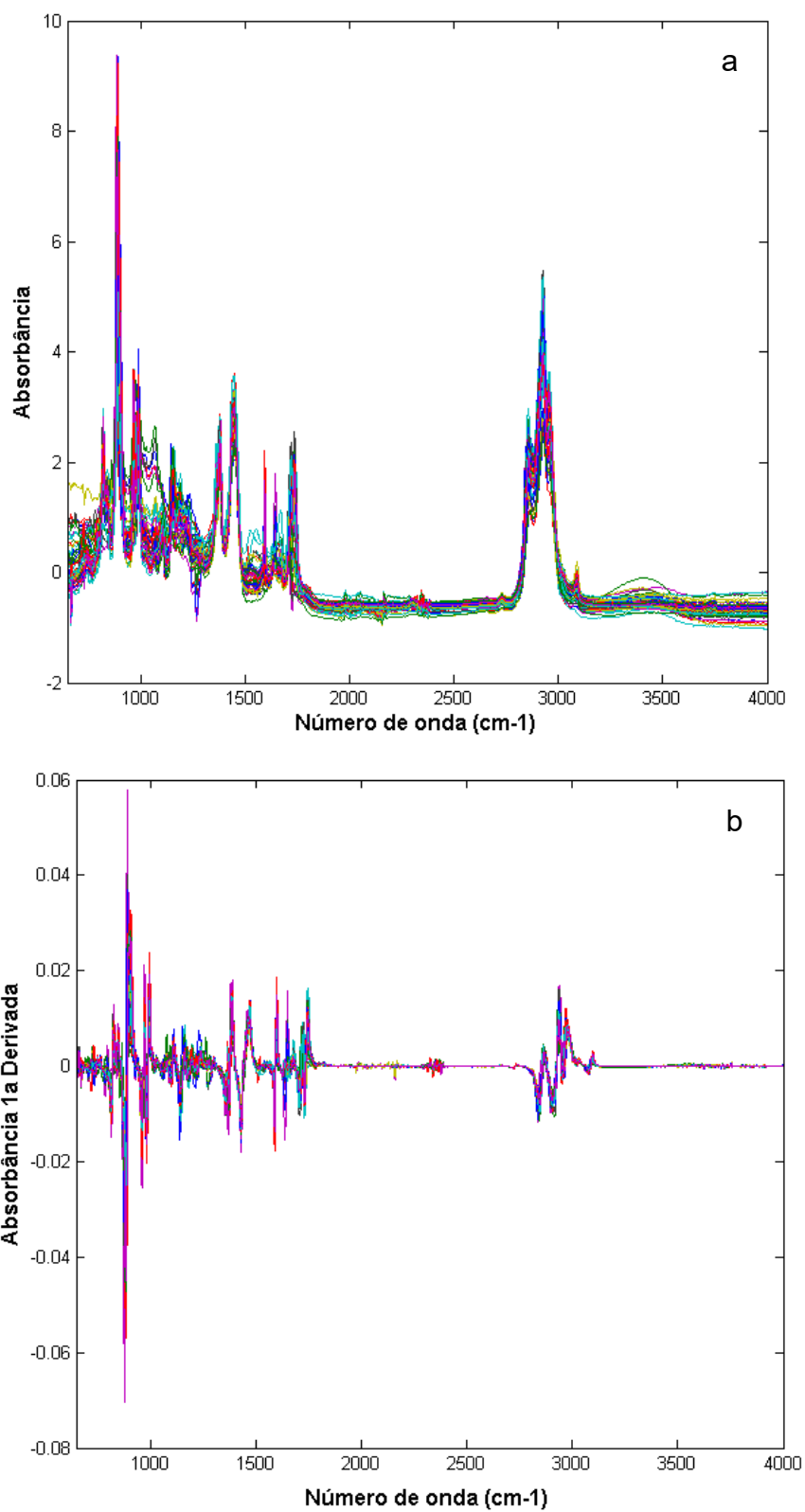


Figura 25 - a) Espectros no IR-médio no modo de absorvância para as 54 amostras. b) Espectros pré-processados com a primeira derivada.

De acordo com o gráfico de variância capturada por componentes principais indicados na Figura 26, o número escolhido de PC foi 4, porque a partir da quinta PC em diante, o aumento da variância não resulta em um ganho significativo de informação por componente e toda a variância incorporada no modelo não discrimina novos agrupamentos, apenas agrega informação sistemática não relevante e ruído aleatório. Portanto, optou-se por manter o modelo com 4 PC, explicando 89,93% da variância total dos dados.

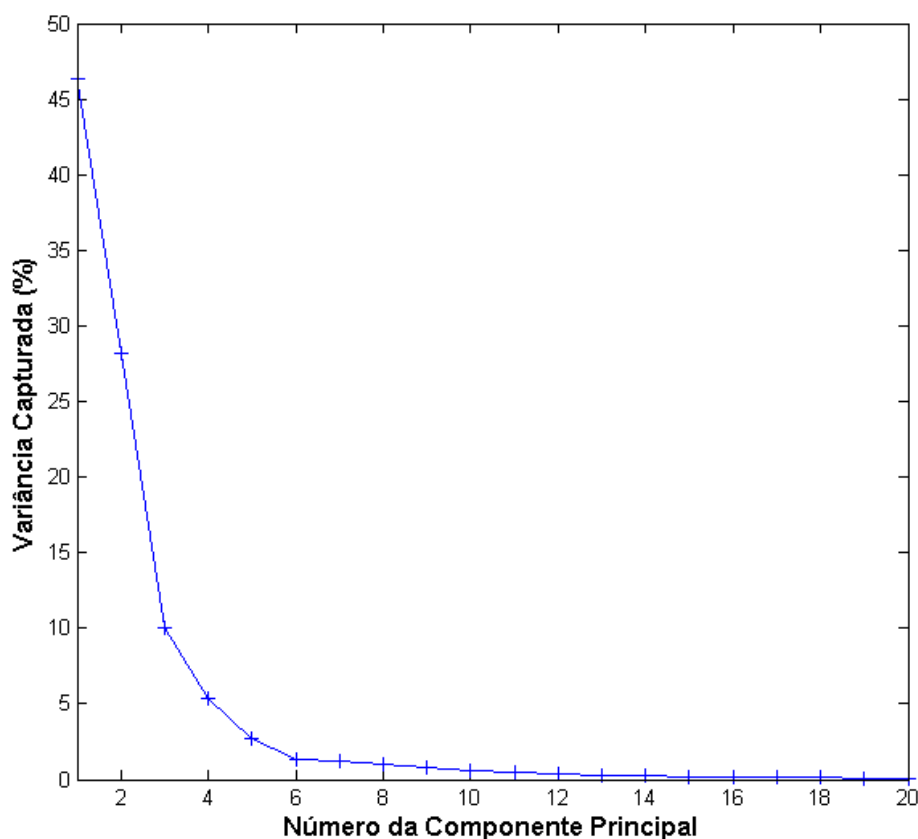


Figura 26 - Gráfico de Variância Capturada por Componente Principal.

Para a elaboração do modelo PCA, as amostras foram pré-definidas/rotuladas, em função da concentração de β -mirceno, em três grupos: baixo teor, contendo amostras até 12%, teor médio, entre 12 e 40%, e alto teor, acima de 40%. Os gráficos de escores de PC1 *versus* PC2 estão mostrados na Figura 27.

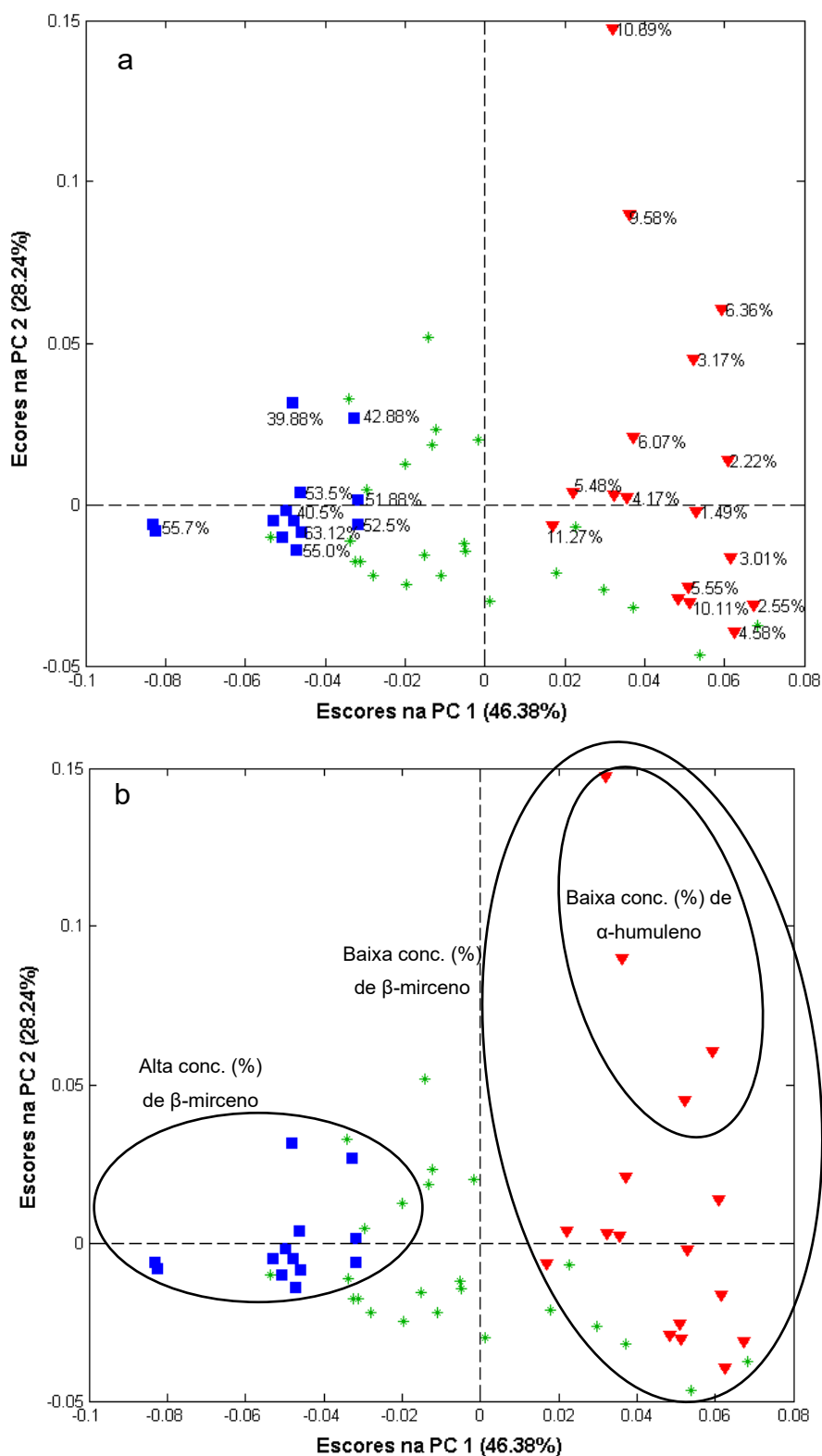


Figura 27 – a) Gráfico de escores de PC1 x PC2 com ênfase nas concentrações de mirceno e b) Gráfico de escores com diagramas dos grupos. Quadrados azuis indicam amostras de alto teor de β -mirceno, cruzes verdes amostras de teor médio, e triângulos vermelhos amostras de teor baixo.

Como se pode ver pelo gráfico de escores da Figura 27, observa-se uma forte influência da concentração de β -mirceno na primeira componente principal, sendo que, salvo algumas exceções, as amostras com maiores concentrações se agruparam na região negativa da PC1, enquanto as de menores concentrações estão presentes na região positiva da PC1. Visto que algumas amostras de teores médios também estão presentes próximas aos extremos da PC1, embora este grupo esteja predominantemente em posição intermediária, pode-se supor que outros compostos dos óleos essenciais também devem influenciar nesses agrupamentos. Portanto, pode-se interpretar PC1, a qual explica quase metade da variância total (46,38%), como uma componente associada ao teor de β -mirceno.

No gráfico de pesos (*loadings*) das duas primeiras PC, mostrados na Figura 28, pode-se atribuir quais bandas de absorção no infravermelho mais influenciaram na projeção das amostras nos escores das regiões positivas ou negativas de cada PC. A parte positiva do gráfico indica a região espectral mais relevante para discriminar as amostras de baixo teor de mirceno, enquanto a parte negativa mostra o contrário, variáveis que discriminam amostras de alto teor (FERREIRA, 2015).

Visto que o conjunto espectral foi pré-processado com a primeira derivada, torna-se um pouco mais difícil a interpretabilidade química do modelo, já que o gráfico de uma derivada acompanha o sentido de crescimento (taxa de variação) de uma função matemática, no caso de uma banda de absorção que se inicia a partir da linha de base, crescendo até um valor máximo e depois decaindo novamente. Então, o espectro derivado indica dois novos picos para cada banda presente, sendo um positivo e outro negativo. De acordo com a Figura 28a, a região que apresentou maior influência em PC1 está associada à banda de absorção de alta intensidade da região R1a de 864 a 938 cm^{-1} , atribuída à deformação da ligação =C-H de alquenos terminais monossubstituídos (PAVIA; KRIZ, 2008). Nota-se através do gráfico de *loadings* que essa mesma banda de absorção está influenciando tanto a região positiva, quanto negativa da PC1. Visto que no espectro não-tratado ocorre um desdobramento dessa banda de absorção em 3 picos, considerou-se que uma parte da banda influenciou os escores positivos da PC1, enquanto outra parte influenciou os escores negativos. Outra faixa relevante do espectro está na região R2a de 1568 a 1620 cm^{-1} , que pode

ser atribuída ao estiramento da ligação C=C de alquenos conjugados. A região R3a de 2700 a 3100 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação C-H dos grupos -CH₂- e -CH₃ e não apresentou uma grande influência em PC1 (PAVIA; KRIZ, 2008). A segunda componente principal apresentou um perfil muito similar à PC1 com uma influência maior da região de 1360 a 1380 cm^{-1} , que corresponde à deformação simétrica da ligação CH₃ de grupos alceno, dimetil geminal, i-propil ou t-butil (PAVIA; KRIZ, 2008).

De acordo com a Figura 12, que indica os principais compostos encontrados nos óleos essenciais de lúpulo, tanto a estrutura química do β -mirceno, quanto do β -farneseno, podem corresponder a essas atribuições espectrais e, provavelmente, estes são os compostos responsáveis pelas maiores influências na primeira componente principal. Outros compostos, tais como o β -felandreno e germacreno, também possuem características similares em termos de ligações duplas, entretanto como normalmente estão presentes em baixíssimas concentrações nos óleos essenciais, a possibilidade desses dois terpenos influenciarem no modelo foi descartada. Visto que a PC 1 apresentou uma boa discriminação das amostras em função da concentração de β -mirceno, pode-se concluir que as interpretações quimiométricas do modelo PCA corroboram essas atribuições espectrais. No caso da PC 2, não se pode afirmar exatamente qual ou quais compostos apresentaram banda de absorção da região R2b entre 1360 e 1380 cm^{-1} , porém o mais provável é que os compostos responsáveis por essa absorção contenham o grupo t-butil, tais como α -humuleno, β -pineno, ou β -cariofileno, os quais estão presentes em concentrações relativamente elevadas nos óleos essenciais. As regiões R1b, R3b e R4b correspondem às mesmas regiões espectroscópicas R1a, R2a e R3a.

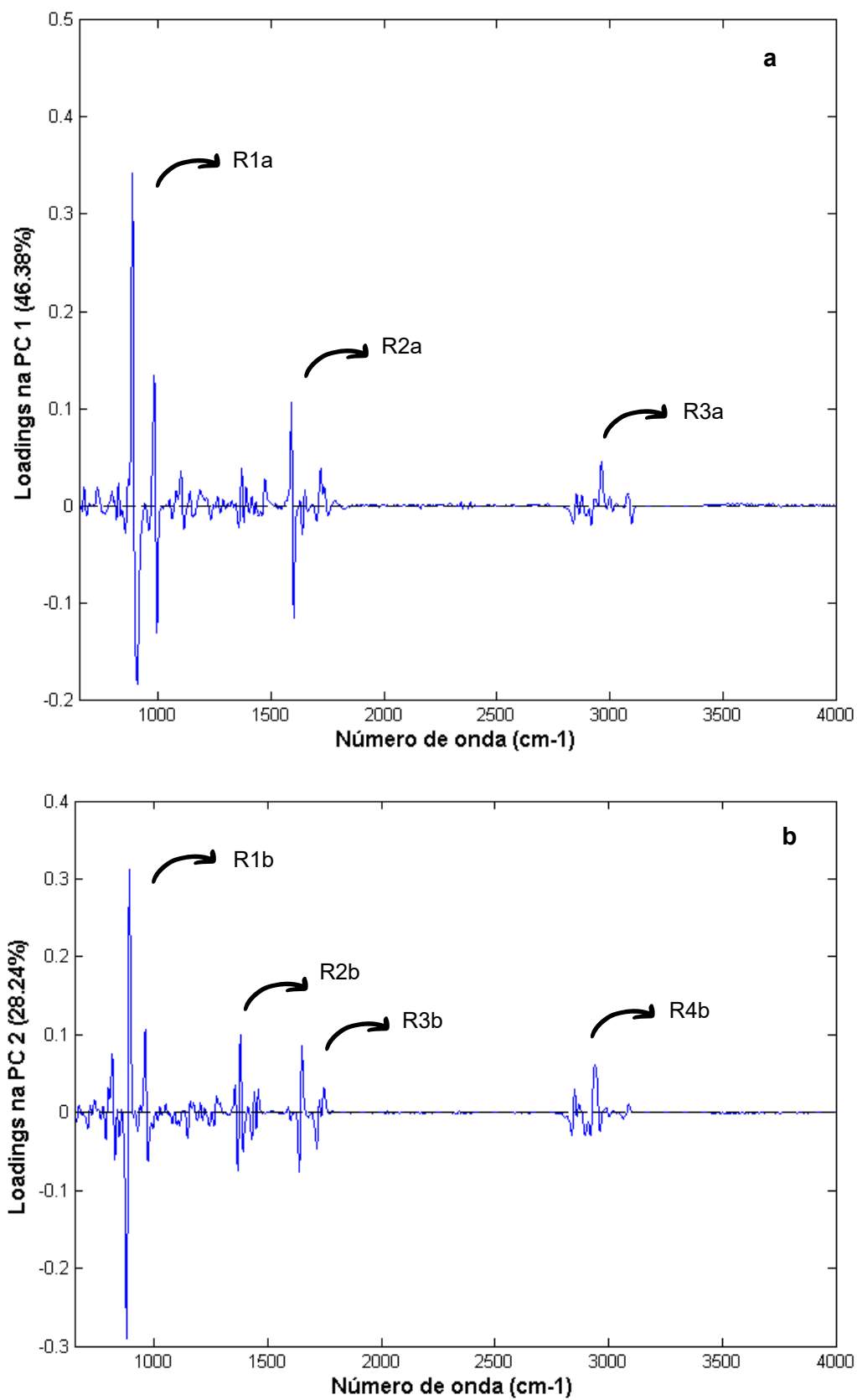


Figura 28 - a) Gráfico de *loadings* na PC1. b) Gráfico de *loadings* na PC2.

4.4.2. HCA

O modelo HCA foi elaborado usando o método de Ward como critério de agrupamento, baseado na distância de Mahalanobis, e combinando-se com os escores de um modelo PCA. Testou-se diferentes pré-processamentos e o que forneceu a melhor discriminação foi a segunda derivada com alisamento de Savitzky-Golay (filtro de 7 pontos, polinômio de segunda ordem), seguida de centrar na média. Utilizou-se duas componentes principais, explicando 71,72% da variância total.

Usando os mesmos critérios de classificação das amostras em função dos teores de β -mirceno, conforme previamente descrito para o modelo PCA (seção 4.4.1), observou-se no dendrograma mostrado nas Figuras 29 (amostras identificadas pelos teores de β -mirceno) e 30 (o mesmo dendrograma com as amostras identificadas pelos códigos) que o modelo HCA também foi capaz de discriminar as amostras de alta e baixas concentrações de β -mirceno. Analisando-se o dendrograma da direita para a esquerda no eixo x, notou-se que as amostras foram agrupadas inicialmente em dois grandes grupos, a partir da distância 12, de modo que as amostras de maiores teores de β -mirceno se agruparam na parte superior do dendrograma e as de menores teores na parte inferior.

Realizou-se a interpretação do dendrograma até o valor aproximado de distância 3,5 (indicado pela linha pontilhada vertical na Figura 30), pois considerou-se como a distância ideal para interpretar os agrupamentos. Ademais, não faz muito sentido buscar tanta especificidade para a análise hierárquica, porque o modelo HCA possui uma variância total explicada de 71,72%, sendo a variância não-explicada dada como variações sistemáticas não relevantes e ruído. Dessa forma, obteve-se 6 agrupamentos de amostras, denominados G1-G6, conforme indicado na Figura 30.

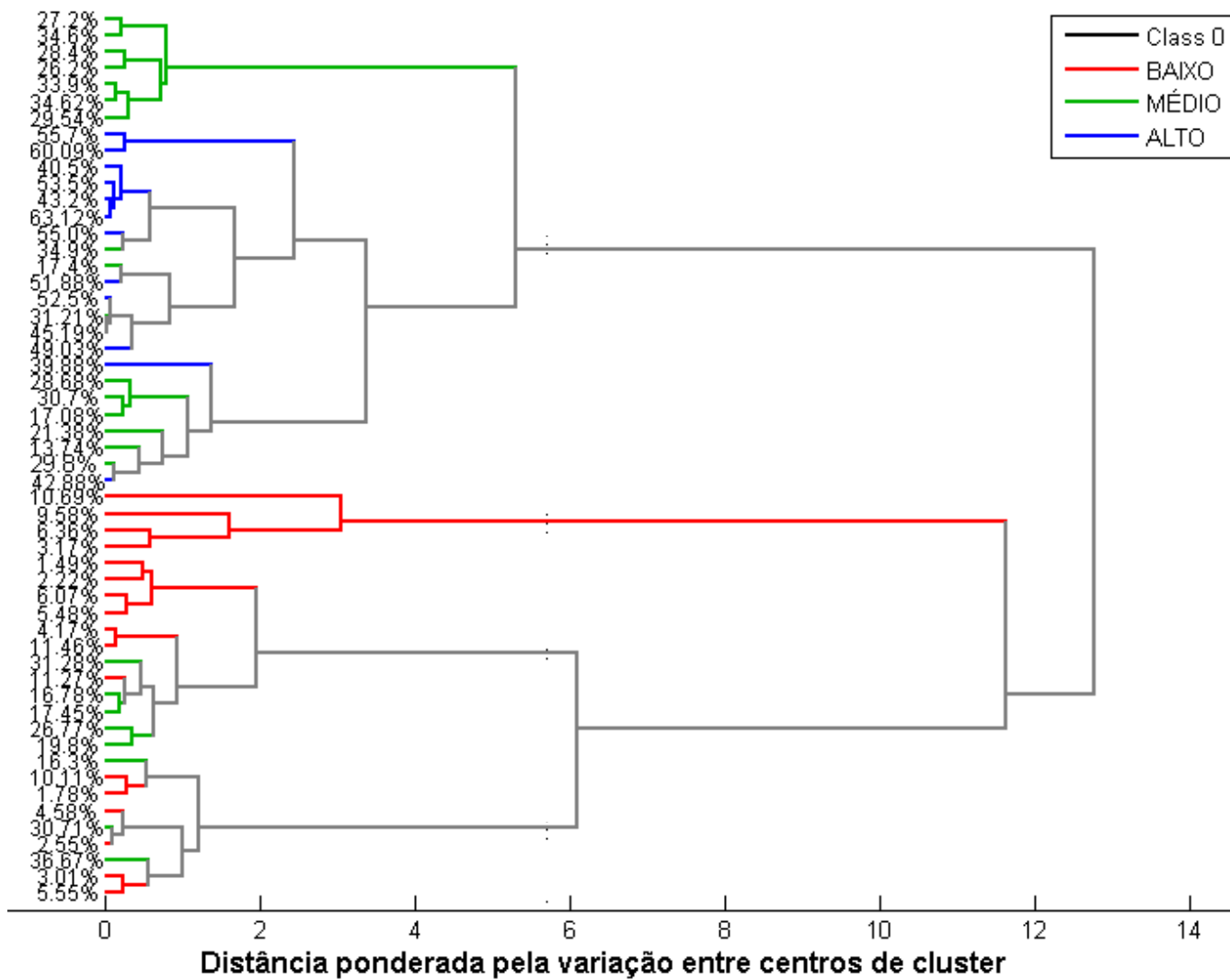


Figura 29 - Modelo HCA para as amostras de óleos essenciais contendo teores de β -mirceno para as amostras.

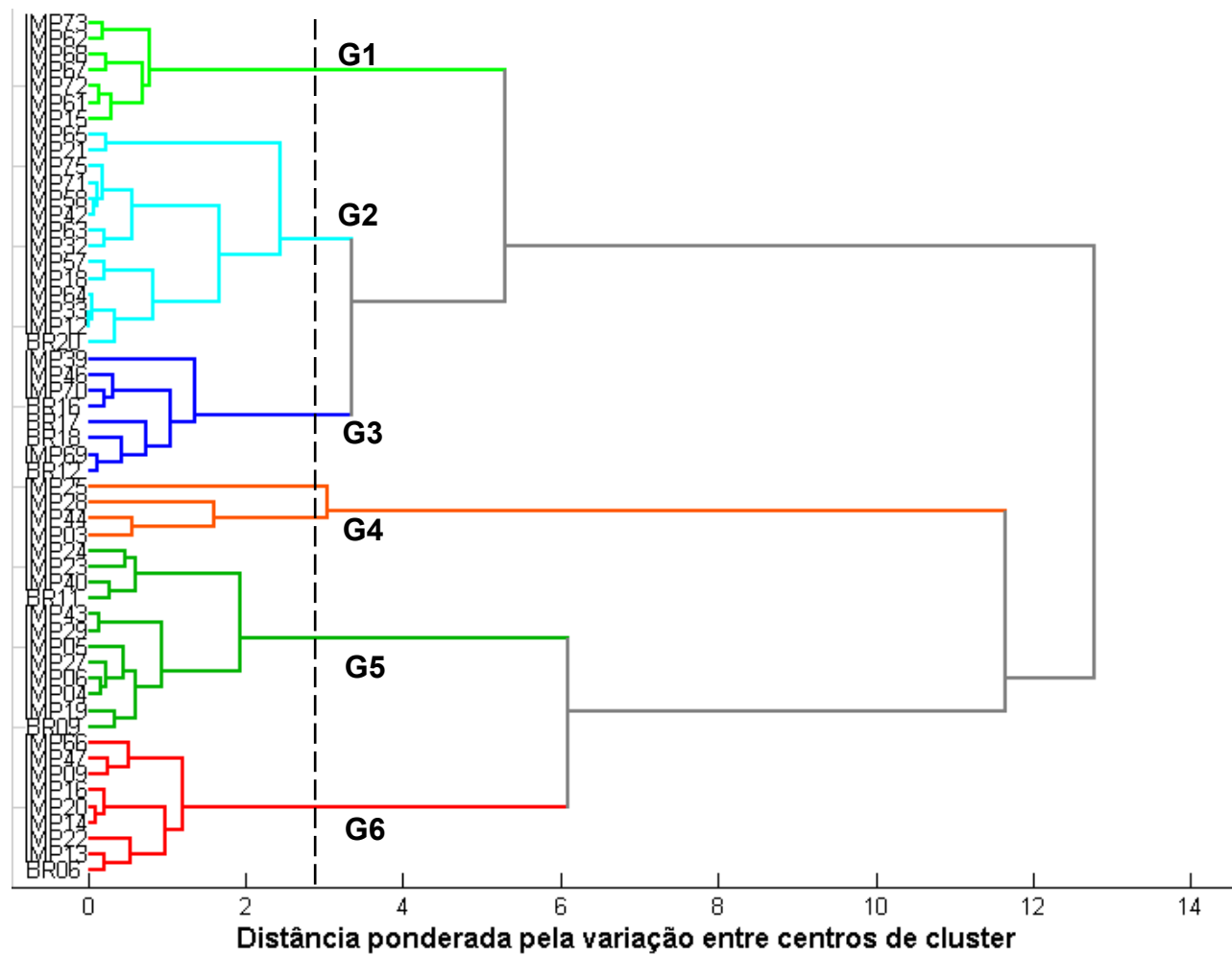


Figura 30 - Modelo HCA para as amostras de óleos essenciais divididas em 6 grupos (G1 a G6) pela linha pontilhada de distância 3,5.

Logo após a discriminação das amostras em dois grandes grupos, a próxima separação se dá por volta de distância 12, valor no qual o modelo discriminou as 4 amostras do grupo G4 em relação às amostras dos grupos G5 e G6. Neste trabalho, realizou-se a quantificação somente do β -mirceno, portanto para dar prosseguimento na interpretação do modelo, fez-se necessário consultar dados cromatográficos completos das variedades dos óleos essenciais. O trabalho de Lopes, realizado no mesmo grupo de pesquisa, utilizou várias amostras em comum com as presentes neste trabalho, portanto seus dados foram utilizados como valores de referência para as concentrações dos outros constituintes presentes nos óleos essenciais. De acordo com seus dados, a discriminação das amostras do grupo G4 pode ser justificada pelo teor de α -humuleno, sendo que as amostras pertencentes aos grupos G5 e G6 apresentaram concentrações significativamente maiores em relação às amostras do grupo G4, como se pode observar na Tabela 4 (LOPES, 2023).

Visto que a discriminação do agrupamento G4 ocorreu em uma distância alta, isso significa que o perfil dos óleos essenciais desse grupo se diferencia em maior grau em relação aos grupos G5 e G6. Tal fato pode ser constatado através do modelo PCA, no qual as quatro amostras projetadas nos escores da região positiva de PC2, representada por um subconjunto próprio, correspondem às amostras do grupo G4: IMP25, IMP28, IMP44 e IMP03. Portanto, através do dendrograma do modelo HCA, foi possível concluir que o α -humuleno possui influência relevante para a região negativa da PC2 e que o quadrante superior direito do modelo PCA consiste nas amostras que apresentam simultaneamente baixos teores de α -humuleno e β -mirceno.

Tabela 4 – Concentrações de dois componentes dos óleos essenciais de lúpulo para as amostras dos grupos G4, G5 e G6

Grupo	Amostra	α -humuleno (% v/v)	β -cariofileno (% v/v)
G4	IMP25	2,50	2,50
	IMP28	3,00	11,50
	IMP44	8,00	5,40
	IMP03	0,018	9,15
G5	BR11	0,87	13,81
	IMP22	19,18	10,80
	IMP24	16,10	13,46
	IMP13	19,08	10,79
	IMP26	24,62	12,91
	BR21	22,11	15,27
G6	IMP20	35,17	12,94
	IMP09	29,69	11,33
	BR23	18,04	10,96

Fonte: (LOPES, 2023).

A próxima discriminação das amostras ocorreu na distância 6, entre os grupos G5 e G6. Como indicado na Tabela 4, as amostras destes dois agrupamentos possuem altas concentrações de α -humuleno, porém a discriminação entre eles pode ser atribuída a uma maior concentração de compostos oxigenados no grupo G5 em relação ao grupo G6.

Para a discriminação dos grupos G1, G2 e G3, organizou-se a Tabela 5, contendo as concentrações de α -humuleno, β -cariofileno e β -farneseno (LOPES, 2023). Nota-se, pela Figura 30 na região superior de alta concentração de β -mirceno, próximo à distância 6, inicialmente as 7 amostras do grupo G1 foram discriminadas em relação aos grupos G2 e G3. Não se encontrou justificativas para esta

discriminação, sendo o grupo G1 o único sem um padrão de agrupamento claro, além de as amostras apresentarem alto teor de β -mirceno. Finalmente, numa distância de aproximadamente $x=3,5$, as amostras dos grupos G2 e G3 se discriminaram devido aos teores de β -farneseno e α -humuleno. As amostras pertencentes ao grupo G2 apresentaram concentrações significativamente maiores de α -humuleno e baixas concentrações de β -farneseno, enquanto as amostras do grupo G3 apresentaram baixas concentrações de α -humuleno e altas concentrações de β -farneseno.

Tabela 5 – Composição dos óleos essenciais de lúpulo para os grupos G1, G2 e G3 (definidos de acordo com a Figura 31)

Grupo	Amostra	α -humuleno (% v/v)	β -cariofileno (% v/v)	β -farneseno (%v/v)
G1	IMP73	18,00	7,75	1,00
	IMP15	20,00	14,00	0,50
	IMP68	47,50	12,50	0,50
	IMP67	29,00	10,20	0,20
G2	IMP12	27,07	0,87	n.d.
	IMP21	14,00	11,50	n.d.
	IMP18	21,65	8,18	n.d.
	BR20	17,50	9,33	n.d.
G3	BR16	n.d.	7,33	21,22
	BR17	n.d.	12,07	12,57
	BR18	n.d.	1,73	25,94
	BR12	0,60	14,40	0,00

Fonte: (LOPES, 2023).

Dessa forma, elaborou-se o Quadro 2, resumindo as descrições das concentrações dos quatro principais compostos responsáveis pela discriminação dos 6 grupos (conforme indicado no modelo HCA da Figura 30).

Quadro 2 – Resumo da classificação das amostras pelos teores dos compostos chave

Grupo	β -mirceno (% v/v)	α -humuleno (% v/v)	β -cariofileno (% v/v)	β -farneseno (% v/v)
G1	Alta	Alta	Alta	Baixa
G2	Alta	Alta	Alta	Baixa
G3	Alta	Baixa	Baixa	Alta
G4	Baixa	Baixa	Alta	Baixa
G5	Baixa	Alta	Alta	Baixa
G6	Baixa	Alta	Alta	Baixa

Os grupos G5 e G6 se discriminaram em relação ao perfil de compostos oxigenados.

Fonte: (LOPES, 2023).

4.4.3. PLS

Os pré-processamentos testados a fim de se obter o modelo PLS com os melhores parâmetros foram os mesmos mencionados para os modelos PCA e HCA. Nesse caso, os pré-processamentos que geraram os melhores resultados foram a segunda derivada com alisamento de Savitzky-Golay (filtro de 7 pontos, polinômio de segunda ordem), seguida de centrar na média. Para a validação cruzada, escolheu-se o método de subconjuntos aleatórios com 20 variáveis latentes e 20 iterações. O conjunto espectral pré-processado está mostrado na Figura 31. A escolha da segunda derivada se justifica pelos mesmos argumentos da primeira derivada, como no modelo PCA, no entanto, a segunda derivada representa a “variação” da taxa de variação, e é ainda mais sensível do que a primeira derivada para se identificar bandas de absorção de baixa intensidade.

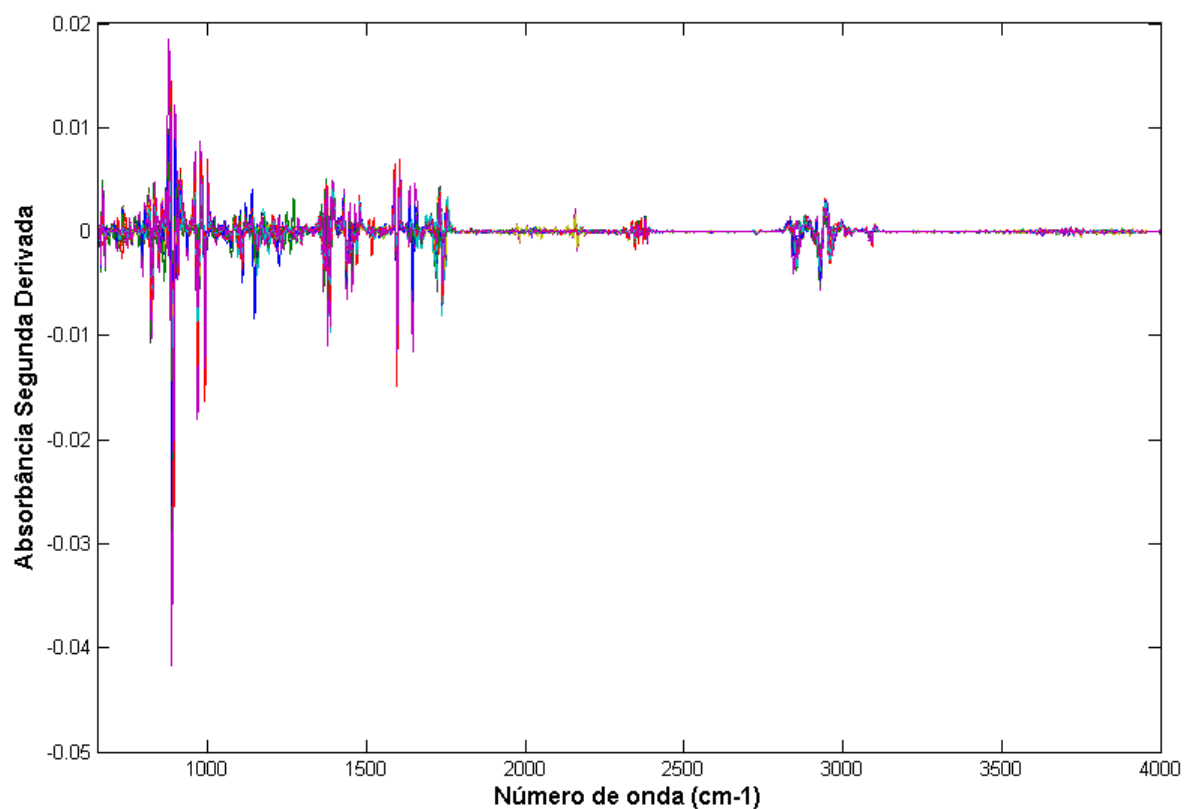


Figura 31 - Conjunto de espectros no IR-médio pré-processado com a segunda derivada e alisamento Savitzky-Golay.

De acordo com a Figura 32, escolheu-se 8 variáveis latentes para a elaboração do modelo PLS por ter apresentado o menor valor de raiz quadrada do erro quadrático de validação cruzada (RMSECV). O valor de RMSECV apresentou um perfil decrescente bem definido, portanto não houve dificuldade nessa escolha.

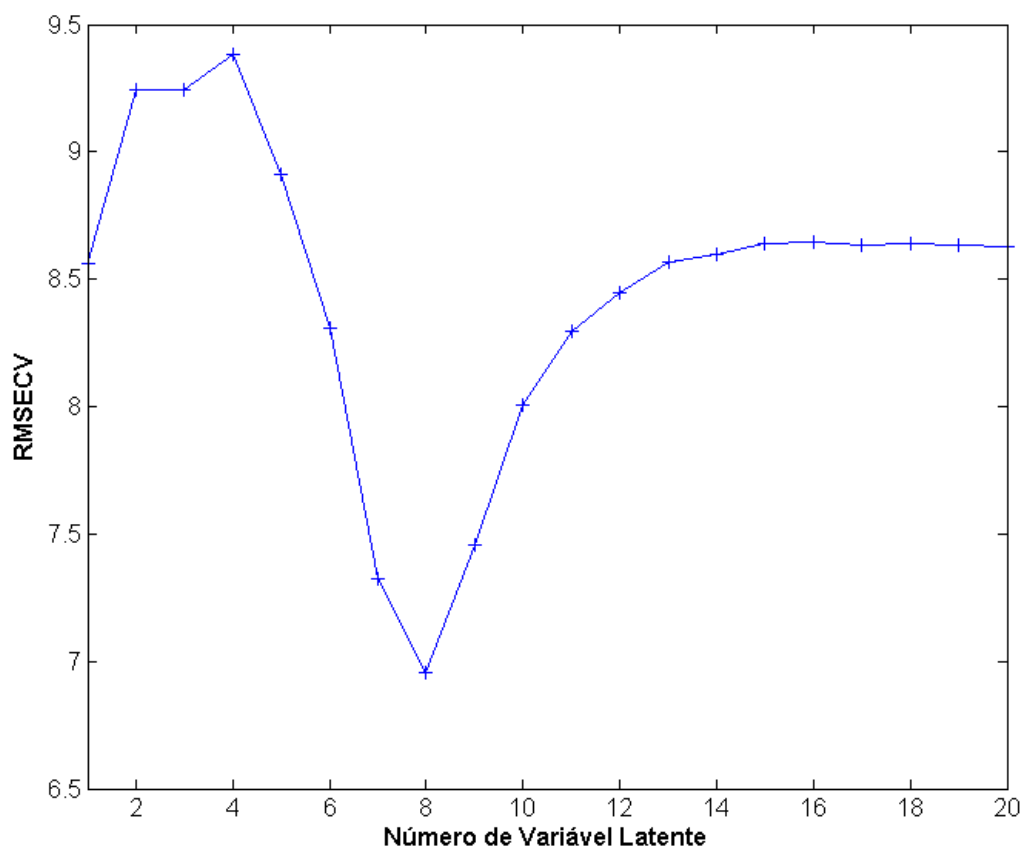


Figura 32 - Valores de RMSECV por Variável Latente

O gráfico de concentrações preditas pelo modelo PLS por concentrações determinadas experimentalmente está indicado na Figura 33, assim como os valores dos parâmetros de indicação de qualidade do modelo quimiométrico antes e após a remoção das amostras, indicados na Tabela 6. De acordo com a literatura, foi respeitado um limite máximo de eliminação de amostras de 22% para o conjunto de calibração e 22% para o conjunto de validação.

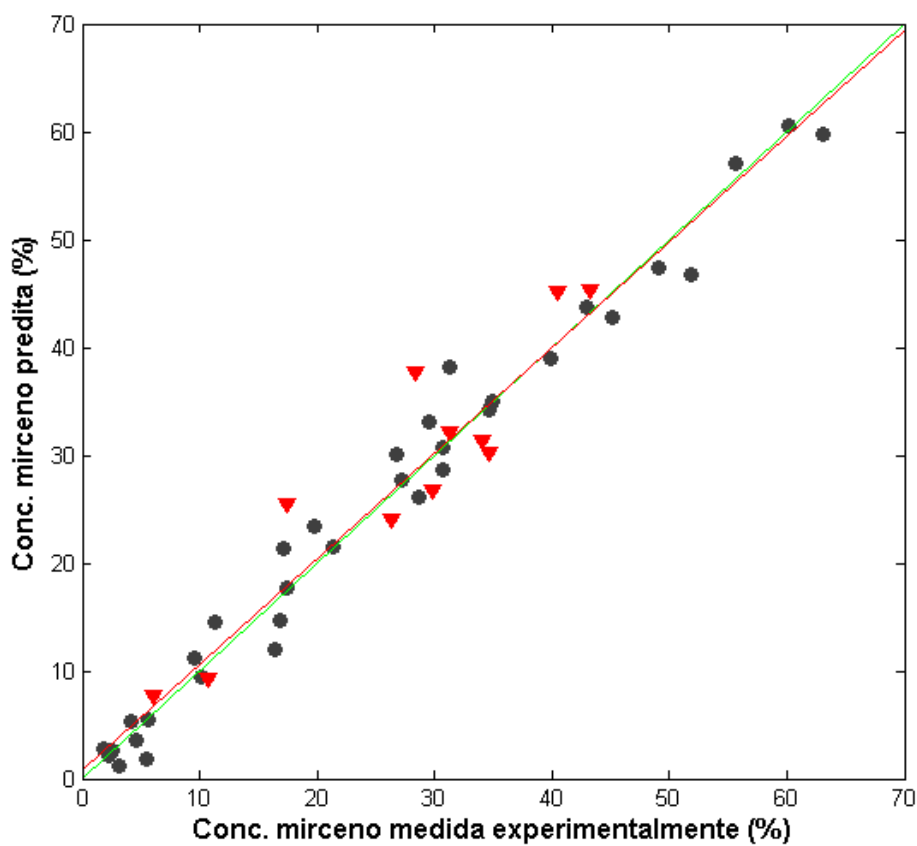


Figura 33 – Ajuste para o modelo PLS, mostrando os valores de referência versus valores previstos. Círculos pretos: amostras do conjunto de calibração. Triângulos vermelhos: amostras do conjunto de validação.

Tabela 6 - Valores das principais figuras de mérito para o modelo PLS

Nº de Amostras	RMSEC (%)	RMSECV (%)	RMSEP (%)	R ²	RPD _{CAL}	RPD _{VAL}
54	2,9	8,3	8,6	0,903	2,18	1,98
45	2,5	6,9	4,5	0,964	2,60	2,59

Segundo a literatura o RPD, conforme equações 7 e 8, é considerado é uma figura de mérito adequada para avaliar a exatidão de modelos multivariados em termos absolutos, independente da faixa analítica (PHIL WILLIAMS; KARL NORRIS, 2001). Este parâmetro é um indicador de qualidade de um modelo quantitativo, sendo

que valores estimados abaixo de 1,5 indicam que o modelo é insatisfatório; entre 1,5 e 2,4, considera-se o modelo satisfatório; e acima de 2,4 considera-se o modelo bom. Visto que nesse trabalho os valores obtidos de RPD para os conjuntos de calibração e validação foram 2,60 e 2,59, respectivamente, concluiu-se que o modelo quimiométrico obtido apresentou um bom desempenho. Como indicado na Tabela 6, o modelo PLS também apresentou boa linearidade, com um valor alto de coeficiente de determinação, $R^2 = 0,964$, além de uma razão RMSEP/RMSEC menor do que 2,5, o que indica que o modelo não está sobreajustado.

$$RPD_{CAL} = \frac{s}{RMSECV} \quad (7)$$

$$RPD_{VAL} = \frac{s}{RMSEP} \quad (8)$$

Conforme as equações 7 e 8, o RPD é diretamente proporcional ao desvio padrão s do vetor de concentrações e inversamente proporcional aos valores dos erros quadráticos. Idealmente, deve-se buscar os melhores valores possíveis para os dois parâmetros. No entanto, é difícil obter baixos valores de RMSEC e RMSEP trabalhando com uma faixa de concentrações tão ampla e utilizando um baixo número de amostras, como neste trabalho. Quando se amplia a faixa analítica, se obtém maiores valores de desvio-padrão, entretanto, normalmente, os erros quadráticos também tendem a aumentar.

Os valores de RMSEP e RMSEC funcionam como parâmetros indicadores da amplitude do erro percentual médio do modelo PLS, apresentando a mesma unidade dos valores do método de referência. Dado que a concentração de β -mirceno é comumente reportada nos pacotes peletizados como uma faixa de valores em virtude da grande variância do teor determinado nas safras de lúpulo, um erro médio de 4,52% de predição não representa um problema diante desta situação de baixa amostragem analítica e de alta complexidade química dos óleos essenciais. Ademais, observa-se que este erro de predição de 4,52% está na mesma magnitude dos coeficientes de

variação determinados na validação do método cromatográfico pelo teste de precisão intermediária, que variou de 2 a 3%. Não é esperado que um modelo de calibração multivariada apresente valores de RMSEP e RMSEC menores do que a incerteza do método de referência. Portanto, considerou-se que os valores obtidos para estes parâmetros são aceitáveis e os objetivos propostos pelo trabalho foram atingidos, mesmo utilizando um número relativamente pequeno de amostras na modelagem de um componente do óleo essencial presente em uma faixa analítica tão ampla. Os vetores informativos, usados na interpretação espectral do modelo, vetor dos coeficientes de regressão e VIP escores, são mostrados na Figura 34.

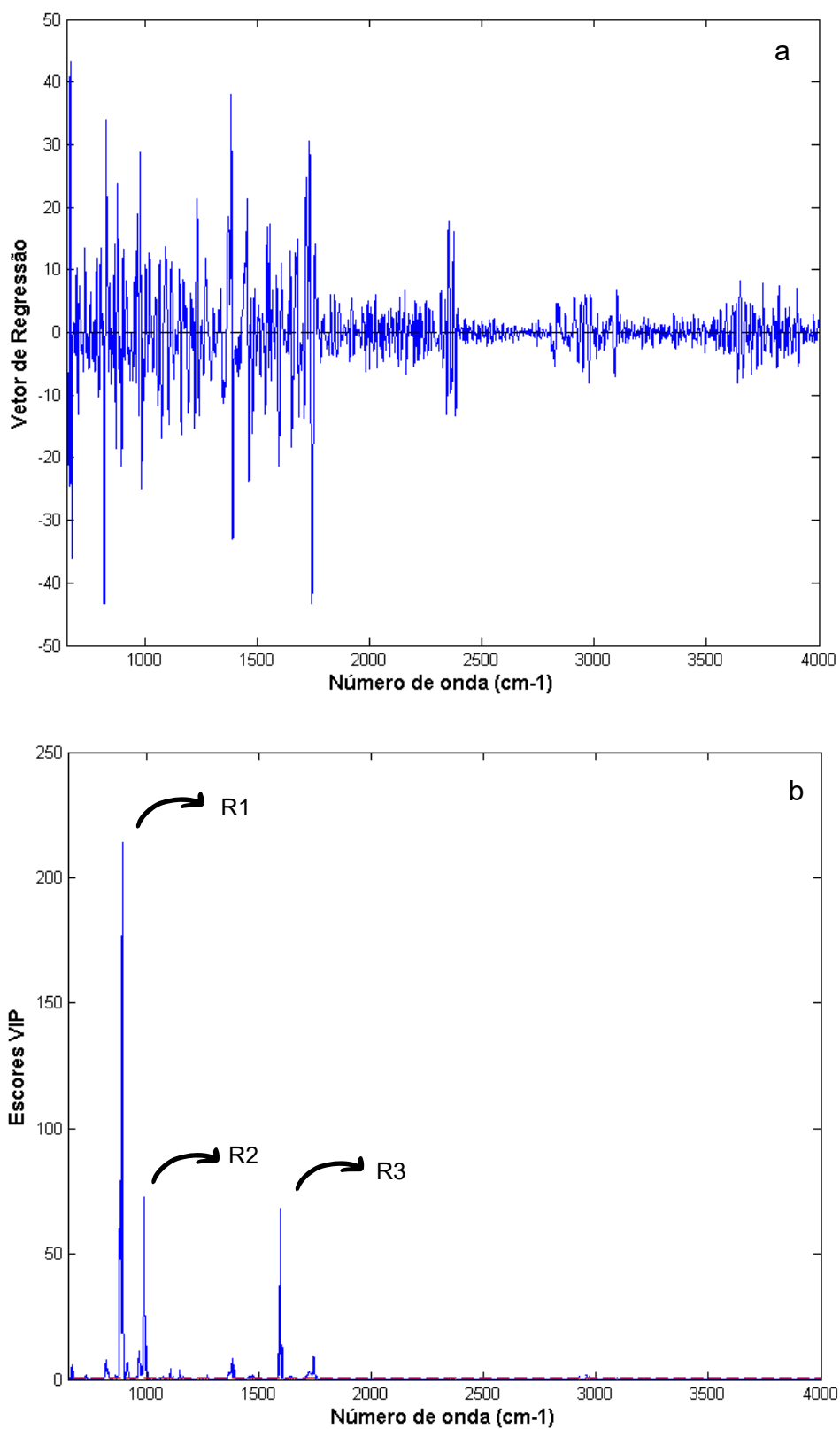


Figura 34 – Vetores informativos do modelo PLS. (a) Vetor dos coeficientes de regressão e (b) Escores VIP com ênfase nas regiões R1, R2 e R3.

Apesar de aparentar um perfil ruidoso, o gráfico dos coeficientes de regressão mostrou esse aspecto em virtude do pré-processamento escolhido para os dados (segunda derivada). Nota-se na Figura 32b, a segunda derivada do conjunto espectral no modo de absorbância tem esse perfil de bastante variabilidade e aparência ruidosa, por conseguinte o vetor de regressão também apresenta um perfil similar.

O gráfico do vetor dos coeficientes de regressão indica as regiões que contribuíram positivamente (associadas ao teor do analito – mirceno) e negativamente (associadas ao teor dos interferentes – outros compostos na matriz) para os o modelo PLS (FERREIRA, 2015). Devido ao aspecto “ruidoso” obtido, as atribuições espectrais das bandas de absorção através da interpretação do vetor de regressão não foram realizadas. Pelo gráfico dos escores VIP (valores em módulo), foi possível identificar mais facilmente as regiões do espectro mais relevantes para o modelo, correspondendo aos números de onda com maiores intensidades (Figura 35b). Assim, as regiões espectrais mais significativas para o modelo PLS foram os dois maiores sinais nas regiões R1 e R2 de 864 a 1000 cm^{-1} , ambos atribuídos à deformação da ligação =C-H de alquenos terminais monosubstituídos, e a região R3 de 1568 a 1620 cm^{-1} , referente ao estiramento da ligação C=C de alquenos conjugados. Visto que a interpretação espectral das regiões mais relevantes para o modelo PLS corrobora com a estrutura química do β -mirceno, pode-se concluir que o modelo foi capaz de usar as informações químicas da molécula-alvo para a quantificação das amostras.

5. CONCLUSÕES

Nesse trabalho, foi possível desenvolver um modelo PLS com bom desempenho para a quantificação de β -mirceno em óleos essenciais de lúpulo, empregando a espectroscopia no IR-médio, como alternativa à técnica cromatográfica tradicional, que foi usada para obter valores de referência para o modelo. Validou-se o método GC-MS, avaliando-se a linearidade por ANOVA em uma faixa de 0,75% a 1,75% v/v, e a exatidão conforme os guias de validação da ISO 17025. A metodologia de referência proposta necessita de pouco volume de óleo essencial, apenas 20 μ L de amostra, o tempo de análise por amostra de 20 minutos é razoável para um método cromatográfico e os limites de detecção e quantificação foram estimados como 0,02% e 0,06% v/v, respectivamente.

A análise exploratória por meio da HCA se mostrou uma ferramenta útil para interpretação de padrões de similaridade do perfil químico dos óleos essenciais, especialmente quando feita conjuntamente com a PCA. Os padrões de agrupamentos observados neste trabalho corroboram os resultados de outros trabalhos presentes na literatura, constatando-se a eficácia de técnicas espectroscópicas para análises de caráter discriminante de matrizes complexas, como óleos essenciais (LOPES, 2023).

Mesmo trabalhando-se em uma faixa de concentrações de β -mirceno extremamente ampla, o modelo PLS apresentou desempenho positivo frente a todos os parâmetros indicadores de qualidade, obtendo-se RPD de calibração de 2,60, e de validação de 2,59, além de uma razão RMSEP/RMSEC abaixo de 2,5 (1,8 – Tabela 6). As atribuições espectrais realizadas através do vetor informativo escores VIP ratificam a estrutura química do β -mirceno. Até o presente momento, não foram encontrados trabalhos na literatura sobre modelos quimiométricos quantitativos aplicados a óleos essenciais de lúpulo, o que reforça a originalidade desta Dissertação.

Visto que o teor de β -mirceno é reportado nos rótulos de lúpulos como uma ampla faixa devido às amostragens em larga escala das colheitas de lúpulo, pode-se inferir que a incerteza das quantificações do modelo PLS desenvolvido não configura um problema, por estar no mesmo patamar do método de referência e das faixas

reportadas na indústria. Ademais, a concentração de β -mirceno dos óleos essenciais não é utilizada nos cálculos de processos cervejeiros, servindo como indicador de perfil sensorial da variedade do lúpulo.

REFERÊNCIAS

ABDU HUSSEN, A. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. **Annals of Advances in Chemistry**, v. 6, 2022.

ABNT. **ABNT NBR ISO/IEC 17025**. 2017.

ADLARD, E. R.; JUVET, R. S. A review of detectors for gas chromatography part II: Selective detectors. **C R C Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 5, 1975.

ALMAGUER, C.; SCHONBERGER, 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**, v. 120, 2014.

ARRUDA, T. R.; PINHEIRO, P. F.; SILVA, P. I.; BERNARDES, P. C. A new perspective of a well-recognized raw material: Phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities and α - and β -acids profile of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **LWT**, v. 141, 2021.

ASBC. Hops 13 - Total Essential Oils in Hops and Hop Pellets by Steam Distillation. **ASBC Methods of Analysis**. 2011.

ASBC; EBC. CURRENT REVIEW. **Journal of the Institute of Brewing**, 1957.

BARTHHAAS. **BarthHaas Report 2021/2022**.

BARTHHAAS. **BarthHaas Report 2022/2023**. .

BARTLE, K. D.; MYERS, P. History of gas chromatography. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, 2002.

BAUERLE, W. L. Disentangling photoperiod from hop vernalization and dormancy for global production and speed breeding. **Scientific Reports**, v. 9, 2019.

BEHR, A.; JOHNNEN, L. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: A critical review. **ChemSusChem**, v. 2, 2009.

BERHANU, A. Microbial profile of Tella and the role of gesho (*Rhamnus prinoides*) as bittering. **International Food Research Journal**, v. 21, 2014.

BRO, R.; ACAR, E.; KOLDA, T. G. Resolving the sign ambiguity in the singular value decomposition. **Journal of Chemometrics**, v. 22, 2008.

BRO, R.; SMILDE, A. K. **Principal component analysis. Analytical Methods**. Royal Society of Chemistry, v.6, 2014.

CAGLIERO, C.; BICCHI, C.; MARENGO, A.; RUBIOLO, P.; SGORBINI, B. Gas chromatography of essential oil: State-of-the-art, recent advances, and perspectives. **Journal of Separation Science**, v.45, 2022.

DASZYKOWSKI, M.; WALCZAK, B. Use and abuse of chemometrics in chromatography. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, 2006.

DE KEUKELEIRE, J.; OOMS, G.; HEYERICK, A.; ROLDAN-RUIZ, I.; BOCKSTAELE, E. V.; DE KEUKELEIRE, D. Formation and accumulation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, 2003.

DELYSER, D. Y.; KASPER, W. J. Hopped Beer: The Case for Cultivation. **Economic Botany**, v.48, 1994.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed, 2009.

DIETZ, C.; COOK, D.; HUISMANN, M.; WILSON, C.; FORD, R. The multisensory perception of hop essential oil: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 126, 2020.

DONALD L. PAVIA; GEORGE S. KRIZ. **Introdução à Espectroscopia**. Cengage Learning, 4. ed. 2009.

DOUGLAS A. SKOOG. **Princípios De Análise Instrumental**. Bookman, 6. ed. 2010

DUARTE, L. M.; AMORIM, T. L.; GRAZUL, R. M.; OLIVEIRA, M. A. L. Differentiation of aromatic, bittering and dual-purpose commercial hops from their terpenic profiles: An approach involving batch extraction, GC-MS and multivariate analysis. **Food Research International**, v. 138, 2020.

DURELLO, R.; SILVA, L.; BOGUSZ JR., S. QUÍMICA DO LÚPULO. **Química Nova**, v. 42, 2019.

EICEMAN, G. A. Instrumentation of Gas Chromatography. Em: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Wiley, 2000.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. **Applied Spectroscopy Reviews**, 2009.

ENGEL, J.; BUYDENS, L.; BLANCHET, L. An overview of large-dimensional covariance and precision matrix estimators with applications in chemometrics. **Journal of Chemometrics**, v. 31, 2017.

ERIKSSON, L.; TRYGG, J.; WOLD, S. A chemometrics toolbox based on projections and latent variables. **Journal of Chemometrics**, v. 28, 2014.

ETTRE, L. S. Chromatography: The separation technique of the 20th century. **Chromatographia**, v. 51, 2000.

EWING, G. E. Infrared Spectroscopy. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 23, 1972.

FERREIRA, M. M. C. FERREIRA. **Quimiometria. Conceitos, Métodos e Aplicações**. 1. ed. Editora Unicamp, 2015.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.2, 2003.

GODOY, J. L.; VEGA, J. R.; MARCHETTI, J. L. Relationships between PCA and PLS-regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 130, 2014.

GOMES, F. O.; GUIMARÃES, B. P.; GHESTI, G. F. Advances in dry hopping for industrial brewing: a review. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 42, 2022.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; FERREIRA, B. L.; MAGGIO, R. M. Use of principal component analysis (PCA) and hierarchical cluster analysis (HCA) for multivariate association between bioactive compounds and functional properties in foods: A critical perspective. **Trends in Food Science and Technology**, v.72, 2018.

GRANATO, D.; PUTNIK, P.; KOVACEVIC, D. B.; SANTOS, J. S.; CALADO, V.; ROCHA, R. S.; DA CRUZ, A. G.; JARVIS, B.; RODIONOVA, O. Y.; POMERANTSEV, A. Trends in Chemometrics: Food Authentication, Microbiology, and Effects of Processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, 2018.

HAAS, J.; MIZAIKOFF, B. Advances in Mid-Infrared Spectroscopy for Chemical Analysis. **Annual Review of Analytical Chemistry**. v. 9, 2016.

HANS MICHAEL ESSLINGER. Handbook of Brewing. Em: **Handbook of Brewing**. Wiley, 2009.

HARDY, A. J.; MACLAURIN, P.; HASWELL, S. DE JONG, S.; VANDEGINSTE, B. G. M. Chemometrics and intelligent laboratory systems Double-case diagnostic for outliers identification. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 34, 1996.

HASLBECK, K.; BUB, S.; SCHONBERGER, C.; ZARNKOW, M.; JACOB, F.; COELHAN, M. On the fate of β -myrcene during fermentation-the role of stripping and uptake of hop oil components by brewer's yeast in dry-hopped wort and beer. **Brewing Science**, v. 70, 2017.

HE, Y.; TANG, L.; WU, X., HOU, X.; LEE, Y. Spectroscopy: The best way toward green analytical chemistry? **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 42, 2007.

HEALEY, J. **The Hops List**. 1. ed. Blurb. 2021.

HIERONYMUS, STAN. **For the love of hops: the practical guide to aroma, bitterness, and the culture of hops**. Brewing Elements. 2012

HONG, K.; XU, Z.; WANG, L.; JOHNPAUL, A.; CHENG, Y.; LV, C.; MA, C. Varietal differences in the phytochemical components' accumulation and aroma profile of three *Humulus lupulus* cultivars. **Food Control**, v. 132, 2022.

JASTROMBEK, J. M.; FAGUERAZZI, M. M.; PIEREZAN, H. C.; RUFATO, L.; SATO, A. J.; RICCE, W. S.; MARQUES, V. V.; LELES, N. R.; ROBERTO, S. R. Hop: An Emerging Crop in Subtropical Areas in Brazil. **Horticulturae**, v. 8, 2022.

JEAN-PIERRE, G. E. **Beer in Health and Disease Prevention**. Academic Press. 2009.

JOHN PALMER. **How to Brew - Tudo que você precisa saber para fazer excelentes cervejas**. 1. ed. 2020

KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, 1969.

KHARBACH, M.; MANSOURI, M. A.; TAABOUZ, M.; YU, H. Current Application of Advancing Spectroscopy Techniques in Food Analysis: Data Handling with Chemometric Approaches. **Foods**. v. 12, 2023.

KISHIMOTO, T.; KOBAYASHI, M.; YAKO, N.; IIDA, A.; WANIKAWA, A. Comparison of 4-mercapto-4-methylpentan-2-one contents in hop cultivars from different growing regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, 2008.

KOVAČEVIČ, M.; KAČ, M. Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils. **Food Chemistry**, v. 77, 2002.

KOWALIK, C.; EINAX, J. W. Modern chemometric data analysis - Methods for the objective evaluation of load in river systems. **Acta Hydrochimica et Hydrobiologica**, v. 34, 2006.

KOWALSKI, B. R. Chemometrics: Views and Propositions. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 15, 1975.

KUBEŠ, J. Geography of World Hop Production 1990–2019. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 80, 2022.

KUMAR, K. Partial Least Square (PLS) Analysis. **Resonance**, v. 26, 2021.

KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G. S.; RAWAL, R. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**. v. 123, 2014.

KUMAR, R.; SHARMA, V. Chemometrics in forensic science. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**. v. 105, 2018.

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. 3. ed. VLB Berlin. 2004.

LAGOS, F. S.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C.; DESCHAMPS, C. Vegetative propagation of hops (*Humulus lupulus* L.): Historical approach and perspectives. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 43, 2022.

LAVINE, B. K.; WORKMAN, J. Chemometrics. **Analytical Chemistry**. v. 85, 2013.

LIN, M.; XIANG, D.; CHEN, X.; HUO, H. Role of Characteristic Components of *Humulus lupulus* in Promoting Human Health. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, 2019.

LOPES, F. G. **Caracterização de óleos essenciais de lúpulos brasileiros e importados**. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023.

MACHADO, J. C.; FARIA, M.; FERREIRA, I. M.P.L.V.O.; PÁSCOA, R. N. M. J.; LOPES, J. A. Varietal discrimination of hop pellets by near and mid infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 180, 2018.

MALOWICKI, M. G.; SHELLHAMMER, T. H. Isomerization and degradation kinetics of hop (*Humulus lupulus*) acids in a model wort-boiling system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, 2005.

MAPA. **LÚPULO NO BRASIL: PERSPECTIVAS E REALIDADES**. 2022.

MARCUSSO, E. F. OS PRIMÓRDIOS DO LÚPULO NO BRASIL: A TRAJETÓRIA ALCOÓLICA BRASILEIRA ATÉ O DOMÍNIO CERVEJEIRO E A INTRODUÇÃO DO LÚPULO. **Revista do Instituto Histórico e Geográfico Brasileiro**, 2022.

MARTINS, Z. E.; MACHADO JR, J. C.; CUNHA, S. C.; BARATA, A. M.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. A chemometric approach to compare Portuguese native hops with worldwide commercial varieties. **Journal of Chemometrics**, v. 34, 2020.

MCADAM, E. L.; VAILLANCOURT, R. E.; KOUTOULIS, A.; WHITTOCK, S. P. Quantitative genetic parameters for yield, plant growth and cone chemical traits in hop (*Humulus lupulus* L.). **BMC Genetics**, v. 15, 2014.

MILOSEVIC, M. Internal reflection and ATR spectroscopy. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 39, 2004.

MOIR, M. Hops - A millennium review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. v. 58, 2000.

MURAKAMI, A.; DARBY, P.; JAVORNIK, B.; PAIS, M.; SEIGNER, E.; LUTZ, A.; SVOBODA, P. Molecular phylogeny of wild Hops, *Humulus lupulus* L. **Heredity**, v. 97, 2006.

OCVIRK, M.; NEČEMER, M.; KOŠIR, I. J. The determination of the geographic origins of hops (*Humulus lupulus* L.) by multi-elemental fingerprinting. **Food Chemistry**, v. 277, 2019.

PAULO, M.; RIBEIRO, S. **Levantamento estatístico APROLÚPULO**. 2021.

PEPI, S.; CHICCA, M.; TELLOLI, C.; ROMA, A. D.; GRISENTI, P.; TESSARI, U.; VACCARO, C. Discrimination of geographical origin of hop (*Humulus lupulus* L.) using geochemical elements combined with statistical analysis. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 41, 2019.

PHIL WILLIAMS; KARL NORRIS. **Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries**. 2. ed. 2001.

PIECZONKA, S. A.; ZARNKOW, M.; DIEDERICH, P.; HUTZLER, M.; WEBER, N.; JACOB, F.; RYCHLIK, M.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Archeochemistry reveals the first steps into modern industrial brewing. **Scientific Reports**, v. 12, 2022.

POŁEĆ, K.; BRONIATOWSKI, M.; WYDRO, P.; HAC-WYDRO, K. The impact of β -myrcene – the main component of the hop essential oil – on the lipid films. **Journal of Molecular Liquids**, v. 308, 2020.

POMERANTSEV, A. L.; RODIONOVA, O. Y. Popular decision rules in SIMCA: Critical review. **Journal of Chemometrics**, v. 34, 2020.

ROBERTS, J. J.; COZZOLINO, D. An Overview on the Application of Chemometrics in Food Science and Technology—An Approach to Quantitative Data Analysis. **Food Analytical Methods**. v. 9, 2016.

RODIONOVA, O. Y.; TITOVA, A. V.; POMERANTSEV, A. L. Discriminant analysis is an inappropriate method of authentication. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 78, 2016.

RONNIE WILLAERT. The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer Fermentation. Em: **Handbook of Food Products Manufacturing**. 2006

RONNIE WILLAERT. Biochemistry of Beer Fermentation. Em: **Food Biochemistry and Food Processing**. 2. ed. 2012.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, 2000.

RUNCKEL, W. J.; GOLDBLATT, L. A. Inhibition of Myrcene Polymerization during Storage. **Industrial & Engineering Chemistry**, v. 38, 1946.

RUTNIK, K.; KNEZ HRNČIČ, M.; JOŽE KOŠIR, I. Hop Essential Oil: Chemical Composition, Extraction, Analysis, and Applications. **Food Reviews International**, v. 00, 2021.

SANZ, V.; TORRES, M. D.; VILARIÑO, J. M. L.; DOMÍNGUEZ, H. What is new on the hop extraction? **Trends in Food Science and Technology**, v. 93, 2019.

SOUZA, S. V. C. **Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análises de alimentos**. Doutorado (Doutorado em Farmácia) Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2007.

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

SURENDRAN, S.; QASSADI, F.; SURENDRAN, G.; LILLEY, D.; HEINRICH, M. Myrcene—What Are the Potential Health Benefits of This Flavouring and Aroma Agent? **Frontiers in Nutrition**, v. 8, 2021.

TAKOI, K.; ITOGA, Y.; TAKAYANAGI, J.; KOSUGI, T.; SHIOI, T.; NAKAMURA, T.; WATARI, J. Screening of geraniol-rich flavor hop and interesting behavior of β -citronellol during fermentation under various hop-addition timings. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 72, 2014.

TING, P. L.; RYDER, D. S. The bitter, twisted truth of the hop: 50 years of hop chemistry. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 75, 2017.

TODESCHINI, R.; BALLABIO, D.; CONSONNI, V. Distances and Other Dissimilarity Measures in Chemometrics. Em: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Wiley, 2015.

VOLLMER, D. M.; SHELLHAMMER, T. H. Influence of hop oil content and composition on hop aroma intensity in dry-hopped beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 74, 2016.

WARD, J. H. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. **Journal of the American Statistical Association**, v. 58, 1963.

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 58, 2001.

WORKMAN, J. J.; MOBLEY, P. R.; KOWALSKI, B. R.; BRO, R. Review of chemometrics applied to spectroscopy: 1985-95, Part I. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 31, 1996.

YANG, M.-Q.; VELZEN, R. V.; BAKKER, F. T.; SATTARIAN, A.; LI, D.-Z.; YI, T.-S. Molecular phylogenetics and character evolution of Cannabaceae. **TAXON**, v. 62, 2013.

APÊNDICE – INFORMAÇÕES REFERENTES ÀS AMOSTRAS

Tabela A1 - Volumes das Extrações dos Óleos Essenciais por 100 g de lúpulo e outras informações referentes às amostras

Código	Lúpulo	País	Safra	Óleos Totais (mL/100g)	Literatura** (ml/100g)	β-mirceno (% v/v)
BR06	Columbus	Brasil	2021	2.2	1,5 – 4,5	5.6
BR09	Galena	Brasil	2021	2.0	0,9 – 1,3	19.8
BR11	Comet	Brasil	2021	2.5	2,0 – 4,5	5.5
BR12	Comet	Brasil	2021	2.9	2,0 – 4,5	42.9
BR16	Centennial	Brasil	2021	1.0	1,5 – 2,5	17.1
BR17	Cascade	Brasil	2021	0.7	0,8 – 1,5	21.4
BR18	H. Mittelfruh*	Brasil	2021	0.8	0,7 – 1,4	13.7
BR20	Nugget	Brasil	2021	0.9	1,5 – 3,0	49.0
IMP03	Comet	EUA	2019	1.2	2,0 – 4,5	3.2
IMP04	Chinook	EUA	2019	2.2	1,5 – 2,7	17.5
IMP05	Galena	EUA	2019	1.6	0,9 – 1,3	31.3
IMP06	Columbus	EUA	2019	2.1	1,5 – 4,5	16.8
IMP09	Sladek	República Tcheca	2018	1.5	1,0 – 2,0	1.8
IMP12	H. Magnum*	Alemanha	2020	2.2	1,9 – 2,3	45.2
IMP13	Millennium	EUA	2019	0.9	1,8 – 2,2	3.0
IMP14	Fuggle	Inglaterra	2019	0.5	0,4 – 0,8	2.6
IMP15	Summit	EUA	2020	1.3	1,5 – 3,0	29.5
IMP16	Willamette	EUA	2020	0.8	1,0 – 1,5	4.6
IMP18	H. Mittelfruh*	Alemanha	2020	1.0	0,7 – 1,4	51.9

IMP19	Nugget	EUA	2020	0.8	1,5 – 3,0	26.8
IMP20	Sorachi Ace	EUA	2020	1.6	1,5 – 3,0	30.7
IMP21	Centennial	EUA	2020	1.5	1,5 – 2,5	60.1
IMP22	Cascade	EUA	2020	1.3	0,8 – 1,5	36.7
IMP23	Mandarina Bavaria	Alemanha	2019	0.7	1,0 – 2,0	2.2
IMP24	H. Spalter*	Alemanha	2019	0.6	0,5 – 1,2	1.5
IMP25	H. Blanc*	Alemanha	2020	0.6	0,8 – 1,5	10.7
IMP27	Sterling	EUA	2017	0.6	0,6 – 1,9	11.3
IMP28	Pride of Ringwood	Austrália	2015	0.5	1,2 – 2,0	9.6
IMP29	Bravo	EUA	2018	1.1	1,6 – 2,4	11.5
IMP32	Amarillo	EUA	2020	1.3	1,5 – 1,9	34.9
IMP33	Taiheke	Nova Zelândia	2018	0.9	1,0 – 1,5	31.2
IMP39	Galaxy	Austrália	2020	1.7	3,0 – 5,0	39.9
IMP40	Callista	Alemanha	2017	0.3	0,9 – 1,4	6.1
IMP42	Citra	EUA	2021	2.0	1,5 – 3,0	63.1
IMP43	Northdown	Inglaterra	2018	0.7	1,2 – 2,5	4.2
IMP44	Ariana	Alemanha	2017	0.6	1,3 – 1,8	6.4
IMP46	Nelson Sauvin	Nova Zelândia	2020	1.3	1,0 – 1,2	28.7
IMP47	Herkules	Alemanha	2020	0.8	1,4 – 2,4	10.1
IMP57	H. Spalter*	Alemanha	2020	0.5	0,5 – 1,2	17.4
IMP58	Pahto	EUA	2019	1.3	1,0 – 2,5	43.2
IMP61	Loral	EUA	2019	0.9	1,3 – 2,3	34.6

IMP62	Styrian Gold	Eslovênia	2021	0.5	1,3 – 2,3	34.6
IMP63	Mistral	França	2020	0.7	1,0 – 1,5	55.0
IMP64	Yellow Sub	Alemanha	2021	1.1	1,0 – 2,5	52.5
IMP65	Bobek	Eslovênia	2020	1.3	0,7 – 4,0	55.7
IMP66	Premiant	República Tcheca	2021	0.8	1,1 – 1,8	16.3
IMP67	H. Perle*	Alemanha	2022	1.0	0,6 – 1,2	26.3
IMP68	H. Tradiction*	Alemanha	2021	0.6	0,9 – 1,9	28.4
IMP69	H. Hersbrucker*	Alemanha	2021	0.8	0,5 – 1,3	29.8
IMP70	Challenger	Inglaterra	2021	0.8	1,0 – 1,7	30.7
IMP71	Crystal	EUA	2021	1.0	0,8 – 1,4	53.5
IMP72	Barbe Rouge	França	2020	1.7	1,1 – 1,6	34.0
IMP73	Cluster	EUA	2020	0.5	0,4 – 0,8	27.2
IMP75	Kazbek	República Tcheca	2021	1,1	0,9 – 2,0	40,5

*Todas as amostras com H. correspondem a abreviação de Hallertau.

**Dados da literatura obtidos por Hopslis, BarthHaas e Hopsteiner.