

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Luiz Guilherme Souza Alves

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO INORGÂNICA E ORGÂNICA DO LÚPULO
(*HUMULUS LUPULUS*) POR ICP-MS E PS-MS**

Belo Horizonte

2022

UFMG/ICEx/DQ. 1.512
D. nº 821

Luiz Guilherme Souza Alves

**DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO INORGÂNICA E ORGÂNICA DO LÚPULO
(*HUMULUS LUPULUS*) POR ICP-MS E PS-MS**

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

Orientadora: Letícia Malta Costa

Belo Horizonte

2022

Ficha Catalográfica

A474d Alves, Luiz Guilherme Souza.
2022 D Determinação da composição inorgânica e orgânica do
lúpulo (*Humulus lupulus*) por ICP-MS e PS-MS
[manuscrito] / Luiz Guilherme Souza Alves. 2022.
73 f. : il., gráfs., tabs.

Orientadora: Letícia Malta Costa.

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

Bibliografia: f. 64-69.

Anexo: f. 70-73.

1. Química analítica - Teses. 2. Cerveja - Teses.
3. Quimiometria - Teses. 4. Preparação de amostra
(Química) - Teses. 5. Espectrometria de massa - Teses.
6. Cromatografia líquida de alta eficiência - Teses.
7. Ácido nítrico - Teses. 8. Água oxigenada - Teses.
I. Costa, Letícia Malta, Orientadora. II. Título.

CDU 043



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

"Determinação da Composição Inorgânica e Orgânica do Lúpulo (*Humulus lupulus*) Por ICP-MS e PS-MS"

Luiz Guilherme Souza Alves

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profa. Leticia Malta Costa - Orientadora
UFMG

Prof. Rodinei Augusti
UFMG

Prof. Bruno Gonçalves Botelho
UFMG

Belo Horizonte, 23 de setembro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Malta Costa, Professora do Magistério Superior**, em 23/09/2022, às 11:37, 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 **Rodinei Augusti, Professor do Magistério Superior**, em 23/09/2022, às 11:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bruno Goncalves Botelho, Professor do Magistério Superior**, em 23/09/2022, às 11:40, 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 **1779181** e o código CRC **C57A0F19**.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer primeiramente a Deus por me abençoar durante todos os dias da minha jornada e à minha família por proporcionar força e esperança nos momentos da minha trajetória acadêmica.

À minha esposa e eterna companheira Tâmila, eu agradeço de coração por ser minha parceira de todos os momentos e entender a minha dedicação. Saiba que não vou me esquecer de toda contribuição, amor e carinho que você me deu nessa jornada.

Agradeço à minha mãe Noésia que, apesar das dificuldades, sempre esteve ao meu lado e me incentivou muito a me empenhar nos meus estudos e deu todo suporte que estava ao seu alcance.

Ao meu irmão Vítor que acreditou no meu sonho e me deu força sempre. Aos meus avós que contribuíram na minha criação e formação de caráter, obrigado por tudo.

Agradeço aos meus queridos mestres que se dedicaram a ensinar e compartilhar todo o seu conhecimento e por me tornar uma pessoa melhor.

Eu gostaria de agradecer também a professora Letícia Malta que fez toda a diferença na orientação do meu trabalho e por todo suporte e conhecimento que ela me trouxe.

Aos membros da banca agradeço pelas correções e preciosas sugestões passadas para a melhor construção deste trabalho.

Aos colegas e professores da equipe LEAQUAA, vocês foram de grande ajuda para a conclusão desse trabalho. Em especial a Fernanda, que me auxiliou a trabalhar com os equipamentos e me auxiliou em diversos momentos da realização deste trabalho.

Aos meus amigos de coração Pedro, Tiago e Victor que sempre foram meus parceiros de lutas e de vitórias, por toda a ajuda e apoio durante este período tão importante da minha formação acadêmica.

A todos os funcionários do Departamento de Química, por todo apoio e por proporcionarem um ambiente propício para o desenvolvimento do meu estudo e trabalho.

Também gostaria de deixar um agradecimento especial à UFMG que foi minha casa durante todos esses anos, onde aprendi muito mais do que conteúdo de disciplinas, e sim conhecimento para a vida.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse sonho, que até pouco tempo era impossível, o meu sincero obrigado!

*“Se você acha que a educação é cara,
espere até ver quanto custa a
ignorância no século XXI.”*

Barack Obama

RESUMO

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO INORGÂNICA E ORGÂNICA DO LÚPULO (*HUMULUS LUPULUS*) POR ICP-MS E PS-MS

Neste trabalho foram desenvolvidos procedimentos analíticos empregando-se a espectrometria de massas por paper spray (PS-MS) para identificar os compostos orgânicos encontrados no lúpulo e a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) para se determinar a composição elementar do lúpulo. Para as análises realizadas por ICP-MS, as amostras foram digeridas em frascos fechados assistido por radiação micro-ondas utilizando-se ácido nítrico diluído e peróxido de hidrogênio. Os elementos Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V foram determinados em 12 amostras de lúpulo de quatro países distintos. A partir das concentrações determinadas, as amostras foram discriminadas em grupos decorrentes dos indicadores geográficos com o uso de ferramentas quimiométricas por análise hierárquica de agrupamento (HCA) e análise dos componentes principais (PCA). Recuperações satisfatórias na faixa de 80 a 119% foram obtidas para todos os analitos, considerando as duas amostras empregadas nos experimentos de adição e recuperação. Para o PS-MS o preparo de amostras foi realizado triturando as amostras de lúpulo em um cadinho de ágata com uma solução de ácido fórmico 1% v v⁻¹. Em seguida, essa solução foi centrifugada e o líquido foi coletado sem o precipitado para ser utilizado para análise. As análises por PS-MS possibilitaram a visualização de íons no espectro de massas para as amostras analisadas tanto no modo negativo quanto no modo positivo, permitindo que estes dados fossem analisados pelos fragmentos encontrados no espectro e identificados conforme a relação massa carga e os estudos na literatura sobre os compostos presentes nas amostras de lúpulo.

Palavras-chave: Lúpulo. Quimiometria. Preparo de amostra. ICP-MS. PS-MS.

ABSTRACT

DETERMINATION OF INORGANIC AND ORGANIC COMPOSITION OF HOPS (HUMULUS LUPULUS) BY ICP-MS AND PS-MS

In this work, analytical procedures were developed using paper spray mass spectrometry (PS-MS) to identify the organic compounds found in hops and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) to determine the elemental composition of hops. For the analyzes performed by ICP-MS, the samples were digested in closed flasks assisted by microwave radiation using dilute nitric acid and hydrogen peroxide. The elements Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb and V were determined in 12 hop samples from four different countries. From the determined concentrations, the samples were broken down into groups resulting from the geographic indicators using chemometric tools by hierarchical cluster analysis (HCA) and principal component analysis (PCA). Satisfactory recoveries in the range of 80 to 119% were obtained for all analytes, considering the two samples used in the addition and recovery experiments. For PS-MS, sample preparation was performed by grinding the hop samples in an agate crucible with a 1% v v⁻¹ formic acid solution. Then, this solution was centrifuged and the liquid was collected without the precipitate to be used for analysis. The PS-MS analyzes allowed the visualization of ions in the mass spectrum for the samples analyzed in both negative and positive modes, allowing these data to be analyzed by the fragments found in the spectrum and identified according to the mass charge ratio and the studies in the literature on compounds present in hop samples.

Keywords: Hops. Chemometrics. Sample preparation. ICP-MS. PS-MS.

LISTA DE ABREVIATURAS

CCT	Tecnologia de célula de colisão (collision cell technology)
DAD	Detecção de matriz de diodo (Diode-Array Detection)
ESI	Ionização por Eletrospray (Eletrospray ionization)
EUA	Estados Unidos da América
HCA	Agrupamento por métodos hierárquicos (Hierarchical Cluster Analysis)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer)
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry)
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IS	Intensidade de sinal
KED	Discriminação por energia cinética (kinetic energy discrimination)
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
LS-MS	Espectrometria de massas por spray em folha (Lift Spray Mass Spectrometry)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MS	Espectrometria de massas (Mass Spectrometry)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC's	Componentes principais (Prinical Component)
PCA	Análises dos componentes principais (Principal Component Analysis)
PS-MS	Espectrometria de massas por spray em papel (Paper Spray Mass Spectrometry)
PVPP	Polivinilpolipirrolidona

RDC	Resolução de diretoria colegiada
RENASEM	Registro Nacional de Sementes e Mudas
STD	Padrão (Standard)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1	Relação do consumo (em porcentagem, %) de bebidas alcoólicas consumida no mundo, Américas e no Brasil.....	15
Tabela 2.1	Proporção dos constituintes presentes no lúpulo, em % m m ⁻¹	20
Tabela 2.2	Lista dos fragmentos de ácidos detectados pelo modo de íon negativo ESI em lúpulo, incluindo produtos de oxidação e degradação.....	27
Tabela 2.3	Lista de polifenóis detectados pelo modo de íon negativo ESI em lúpulo.....	27
Tabela 4.1	Amostras de lúpulo analisadas, país de origem e características.....	36
Tabela 4.2	Condições operacionais utilizadas no ICP-MS	39
Tabela 4.3	Condições operacionais utilizadas no PS-MS	40
Tabela 5.1	Parâmetros analíticos para a determinação de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V por ICP-MS	42
Tabela 5.2	Experimento de recuperação para Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V (µg L ⁻¹ , média ± desvio padrão, n = 3 e % de recuperação) por ICP-MS com o uso de germânio como padrão interno	46
Tabela 5.3	Concentrações de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V determinadas nas amostras de lúpulo por ICP-MS	48
Tabela 5.4	Fragmentos analisados nas amostras de lúpulo usando o modo negativo	56
Tabela 5.5	Fragmentos analisados das amostras no modo positivo	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Folhas e flores do lúpulo.....	16
Figura 2.1	Esquema do processo clássico de elaboração da cerveja....	19
Figura 2.2	Estrutura dos principais componentes e possíveis radicais dos α -ácidos	21
Figura 2.3	Estrutura dos principais componentes e possíveis radicais dos β -ácidos	21
Figura 2.4	Estrutura de alguns flavonoides presentes no lúpulo.....	22
Figura 2.5	Representação do funcionamento da técnica de PS-MS.....	24
Figura 2.6	Fórmulas dos principais α - e β -ácidos presentes no lúpulo e seus fragmentos nos modos positivo e negativo.....	26
Figura 2.7	Reações de regeneração de HNO ₃ em frasco fechado com H ₂ O ₂	29
Figura 2.8	Representação da célula de colisão removendo as interferências poliatômicas ³⁵ Cl ¹⁶ O ⁺ , ⁴⁰ Ar ¹² C ⁺ , ⁴⁰ Ar ³⁵ Cl ⁺ , para análise de ⁵¹ V ⁺ , ⁵² Cr ⁺ e ⁷⁵ As ⁺	31
Figura 5.1	Gráficos das curvas de calibração com e sem adição de padrão para os analitos Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V.....	44
Figura 5.2	HCA dos resultados de concentração dos analitos inorgânicos determinados por ICP-MS.....	51
Figura 5.3	PCA dos resultados de concentração dos analitos inorgânicos determinados por ICP-MS.....	52
Figura 5.4	Gráfico biplot da PCA dos resultados de concentração dos analitos inorgânicos determinados por ICP-MS.....	53
Figura 5.5	Espectro de massas das amostras (A) SAAZ, (B) Galena, (C) Galena nac., (D) Chinook nac. no modo negativo na faixa de 250-500 m/z.....	55
Figura 5.6	Espectro de massas das amostras (A) SAAZ, (B) Galena, (C) Galena nac., (D) Chinook nac. no modo positivo a faixa de 300-500 m/z.....	60

Figura S1	Espectro de massas da análise realizada com a solução 1 na otimização da técnica (metanol e água ultrapura 1:1 v v ⁻¹)	70
Figura S2	Espectro de massas da análise realizada com a solução 2 na otimização da técnica (metanol 100% v v ⁻¹)	70
Figura S3	Espectro de massas da análise realizada com a solução 3 na otimização da técnica (ácido fórmico 1% v v ⁻¹ e metanol 1:1 v v ⁻¹)	71
Figura S4	Espectro de massas da análise realizada com a solução 4 na otimização da técnica com uma distância de 3 mm do papel ao equipamento. (ácido fórmico 1% v v ⁻¹)	71
Figura S5	Espectro de massas da análise realizada com a solução 4 na otimização da técnica com uma distância de 5 mm do papel ao equipamento	72
Figura S6	Gráfico de loadings da PC1 obtida na PCA dos analitos inorgânicos determinados por ICP-MS.....	72
Figura S7	Gráfico de loadings da PC2 obtida na PCA dos analitos inorgânicos determinados por ICP-MS.....	73

Sumário

1. Introdução	15
2. Revisão Bibliográfica	19
2.1. Constituintes do lúpulo	19
2.2. Legislação para produção e comercialização do lúpulo e cerveja	22
2.3. Espectrometria de massas por Paper Spray (PS-MS)	23
2.4. Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)	28
2.4.1. Estratégias de calibração em ICP-MS e interferências.....	30
2.5. Quimiometria	32
3. Objetivos	35
3.1. Objetivo geral	35
3.2. Objetivos específicos	35
4. Material e métodos	36
4.1. Amostras.....	36
4.2. Instrumentação	37
4.3. Reagentes e soluções.....	37
4.4. Preparo de amostras.....	38
4.4.1. Preparo de amostra para as análises por ICP-MS - Digestão assistida por radiação micro-ondas.....	38
4.4.2. Preparo de amostra para as análises por PS-MS	38
4.5. Análise das amostras	39
4.5.1. Determinação elementar por ICP-MS.....	39
4.5.2. Análise por PS-MS.....	40
5. Resultados e discussão	42
5.1. Determinações elementares em amostras de lúpulo por ICP-MS	42
5.1.1. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)	42
5.1.2. Avaliação da exatidão	43
5.1.3. Concentração dos elementos nas amostras de lúpulo por ICP-MS...47	
5.1.4. Análises quimiométricas dos resultados dos analitos inorgânicos por HCA e PCA	50
5.2. Detecção de compostos orgânicos nas amostras de lúpulo por PS-MS.54	
5.2.1. Testes de otimização.....	54

5.2.2. Avaliação dos espectros no modo negativo por PS-MS	55
5.2.3. Avaliação dos espectros no modo positivo por PS-MS	59
6. Conclusão	63
Referências bibliográficas.....	64
Anexos	70

1. Introdução

O consumo de bebidas alcoólicas no mundo cresceu consideravelmente nos últimos anos, principalmente no Brasil. Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) do ano de 2018, a média mundial de consumo de álcool per capita foi de 6,4 litros de álcool puro, enquanto o consumo estimado no Brasil, considerando o ano de 2016, foi de 7,8 litros [1]. Nos países da América, o consumo de cerveja lidera em relação aos destilados. A Tabela 1 demonstra a distribuição do consumo de álcool registrado por tipo de bebida considerando o mundo, as Américas e o Brasil.

Tabela 1.1 - Relação do consumo (em porcentagem, %) de bebidas alcoólicas consumida no mundo, Américas e no Brasil [1].

Tipo de bebida	Mundo	Américas	Brasil
Cerveja	34,3	53,8	61,8
Destilado	44,8	31,7	34,3
Vinho	11,7	13,5	3,4
Outras	9,3	0,9	0,5

A cerveja tornou-se popular e segue no topo das preferências entre os brasileiros, podendo-se observar seu destaque em relação às demais bebidas alcoólicas [1]. A produção de cerveja é realizada pela fermentação do mosto cervejeiro, produzido utilizando malte de cevada e lúpulo, seguido de fermentação por leveduras cervejeiras. O lúpulo (Figura 1.1) é uma das matérias-primas mais importantes no processo de fabricação da cerveja, conferindo-a amargor para equilibrar o forte doce do malte, além de ser um conservante natural [2].



Figura 1.1 - Folhas e flores do lúpulo [3].

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta cultivada nas zonas mais temperadas do mundo por suas inflorescências femininas e é uma planta dióica da família *Canabaceae* que adiciona amargor e aroma a cerveja. Ele é constituído por diversos óleos essenciais e polifenóis que variam de proporção de acordo com a região de cultivo [4]. Os compostos e diferentes tipos de lúpulo apresentam composições minerais e orgânicas diferentes, desse modo, a determinação elementar e de compostos orgânicos em amostras de lúpulos, bem como a possibilidade de verificar sua origem geográfica auxiliam no controle da qualidade desses produtos e, conseqüentemente, das cervejas.

O uso de indicadores geográficos permite aos produtores obter reconhecimento do mercado e garante maior segurança aos compradores. Por sua vez, o mal uso destes indicadores geográficos, por pessoas não autorizadas, é extremamente prejudicial para ambas as classes, consumidores e produtores legítimos [5]. Nesse sentido, o desenvolvimento de novas e mais eficientes técnicas para determinar a origem geográfica dos produtos agrícolas é altamente desejada pelos consumidores, agricultores, revendedores e autoridades administrativas. Estudos envolvendo o desenvolvimento de métodos para a identificação da origem geográfica desses produtos são avaliados desde 1980. Tais métodos foram desenvolvidos com base na determinação de componentes orgânicos, na análise qualitativa ou quantitativa dos minerais, nas proporções dos isótopos mais leves ou pesados de alguns elementos, entre outros [5].

A análise quimiométrica dos dados fornecidos pelos instrumentos analíticos, principalmente para aqueles que possuem capacidade multielementar de quantificação é uma ferramenta eficiente que auxilia na determinação da origem de um alimento. Uma vez que os componentes apresentem

características que possam definir um caráter discriminatório de sua origem, estes atributos podem formar um padrão capaz de distinguir uma amostra de outra, em função de sua origem. Nesse sentido, a análise quimiométrica permite detectar estes padrões e ainda possui grande utilidade quanto maior o número de componentes utilizados na diferenciação do modelo [5]–[7]. Neste trabalho, a determinação dos elementos Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V foi realizada por espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) após digestão de amostra assistida por radiação micro-ondas e a identificação de alguns dos metabólitos por PS-MS, em doze amostras de lúpulo de diferentes países.

Considerando a análise da composição orgânica, alguns equipamentos como o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com Detecção de matriz de diodo (HPLC-DAD) e o Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado a Ionização por Eletrospray (HPLC–ESI-MS/MS) foram devidamente utilizados para a determinação de compostos fenólicos. P.J. Magalhães e colaboradores (2009) realizaram com êxito a análise de compostos fenólicos no lúpulo por adsorção de compostos fenólicos da matriz para polivinilpirrolidona (PVPP) e posteriormente a dessorção dos polifenóis adsorvidos com acetona e água. Posteriormente, diversos compostos foram determinados, como a lupulona, colupulona, humulona e cohumulona [8].

Por sua vez, para a determinação elementar em amostra de lúpulo, a técnica de ICP-MS é uma excelente alternativa para a determinação simultânea de diferentes elementos em um curto período. Como exemplo, Liu e colaboradores utilizaram a técnica de ICP-MS para determinar a concentração de vinte e dois elementos em amostras de lúpulo de origem chinesa com considerável êxito. Neste trabalho, cinquenta amostras de lúpulo da região de Xinjiang na China, sendo que cada um dos cinco produtores citados neste trabalho forneceu dez amostras, foram preparadas por digestão ácida em micro-ondas utilizando-se ácido nítrico e peróxido de hidrogênio e posteriormente analisadas no ICP-MS e na espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Por fim, uma análise quimiométrica destes resultados permitiu avaliar diversos indicadores geográficos para o plantio na região [9].

A espectrometria de massas (MS) é uma poderosa técnica analítica capaz de realizar a análise dos valores de massa carga dos íons obtidos das amostras [10]. Tal método apresenta diversas vantagens, como a alta seletividade, baixos limites de detecção e ampla versatilidade [11]. Em geral, a espectrometria de massas é utilizada para descrever a composição de uma amostra gerando um espectro de massas que representa a massa dos componentes desta amostra. Esse espectro é obtido primeiramente ionizando a amostra, separando os íons de diferentes massas e registrando sua abundância relativa pela medição das intensidades do fluxo deste íon. Essa técnica é comumente combinada com outras técnicas [5]. Para isso, novas fontes de ionização têm sido desenvolvidas e os analisadores de massas estão sendo cada vez mais aperfeiçoados. Além disso, estes equipamentos podem ser acoplados com outros métodos de análise, possibilitando um aumento da resolução, sensibilidade, faixa de trabalho e precisão [11].

Considerando a determinação de compostos orgânicos no lúpulo e as técnicas existentes no mercado, ainda há uma demanda de obtenção de resultados de forma mais rápida, barata e que necessitam de menores preparos de amostra, possibilitando assim a produção de cerveja de forma mais rápida e eficiente. Nesse sentido, a utilização da técnica de PS-MS para a determinação de compostos orgânicos em lúpulo é uma estratégia viável e promissora.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Constituintes do lúpulo

As flores de lúpulo (Figura 1.1) são usadas na fabricação da cerveja introduzindo sabor e amargor na bebida, conferindo, em função de sua variabilidade, diferentes sabores à cerveja. A temperatura de cultivo, solo, umidade e outras variáveis climáticas pelas quais foram submetidos os plantios afetam diretamente no sabor do lúpulo [3]. A relevância do lúpulo na cerveja o faz uma das matérias primas essenciais em sua elaboração. O uso dessa planta se faz presente no processo de fervura conforme esquema apresentado na Figura 2.1.



Figura 2.1 - Esquema do processo clássico de elaboração da cerveja [3].

No processo de elaboração da cerveja, o lúpulo é adicionado no início da fervura, após a mostura e a filtração deste. Durante o cozimento, a planta libera suas resinas de sabor amargo (α e β -ácidos), dando o sabor típico da cerveja. Na fervura, a planta também libera óleos essenciais que aromatizam, mas que são eliminados com o tempo de cozimento. Por esse motivo, é feita uma nova adição de lúpulo no final da fervura, com o intuito de extrair e manter os aromas da planta [12].

A descrição dos constituintes do lúpulo é ampla, podendo ser feita agrupando-se os metabólitos da planta em resinas totais, óleos essenciais, proteínas, polifenóis e outros. Na Tabela 2.1 é possível observar as principais classes de compostos que compõem o lúpulo[13].

Tabela 2.1 - Proporção dos constituintes presentes no lúpulo, em % m m⁻¹ [13].

Constituinte	Quantidade % (m m ⁻¹)
Resinas totais	15 a 30
Óleos essenciais	0,5 a 3
Proteínas	15
Monossacarídeos	2
Polifenóis	4
Pectinas	2
Aminoácidos	0,1
Ceras e esteróides	Traço a 25
Cinzas	8
Água	≈ 10
Celulose/lignina	≈ 43

Dos constituintes do lúpulo descritos na Tabela 2.1, as resinas são responsáveis por conferir o amargor à cerveja, sendo essas classificadas como α -ácidos (família das humulonas) e β -ácidos (isômeros das lupulonas). Os α -ácidos são utilizados durante a elaboração da bebida para trazer um gosto mais amargo, enquanto os β -ácidos possuem propriedades antimicrobianas [13].

Os α -ácidos são a parte mais importante das resinas do lúpulo. Estes são eliminados pelas glândulas de lupulina dos cones de lúpulo no formato de um pó amarelo [14]. Os α -ácidos são compostos por seis humulonas equivalentes que podem ser encontrados nas diversas variedades de lúpulo, sendo os principais a humulona (35% a 70% do total de α -ácidos), a cohumulona (20% a 55%) e a adumulona com uma taxa média próxima de 10% a 15% [15]. As estruturas químicas desses α -ácidos são apresentadas na Figura 2.2.

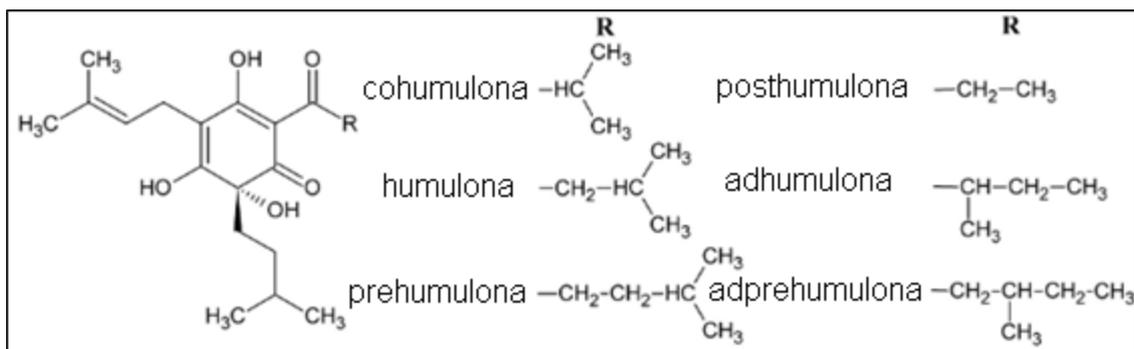


Figura 2.2 - Estrutura dos principais componentes e possíveis radicais dos α -ácidos [16].

Semelhante aos α -ácidos, os β -ácidos consistem em vários equivalentes, compostos por lupulona (30% a 55% do total de β -ácidos), colupulona (20% a 55%), adlupulona (5% a 10%), prelupulona e pós-lupulona [15]. Esses compostos são em grande parte hidrofóbicos e, por isso, de pouca importância no processo de elaboração da cerveja. Porém, devido as suas atividades biológicas, eles são estudados para serem utilizados em muitas aplicações biomédicas em potencial [16], o que faz com que estes sejam importantes para a análise do lúpulo. As estruturas químicas desses β -ácidos estão apresentadas na Figura 2.3.

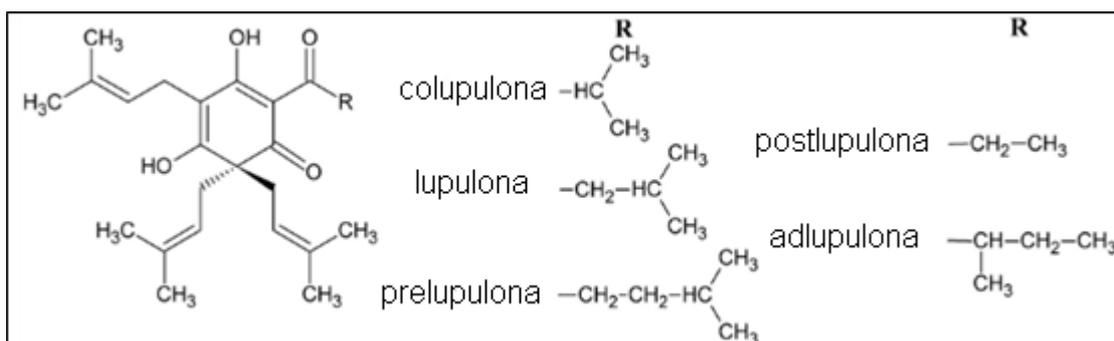


Figura 2.3 - Estrutura dos principais componentes e possíveis radicais dos β -ácidos [16].

Assim como as resinas do lúpulo, os óleos essenciais são metabólitos secundários extraídos da planta e secretados pelas glândulas de

lupulina. Por definição, a parte chamada de óleo do lúpulo é volátil. Esses compostos aromáticos voláteis são considerados "essenciais", pois eles dão ao lúpulo seu cheiro característico. Os óleos essenciais são os responsáveis por trazer o aroma e sabor à cerveja [13].

Os flavonoides ou também chamados de polifenóis, são estudados nos trabalhos relacionados ao lúpulo, uma vez que suas características se refletem no produto que dá origem à turbidez da cerveja [17]. Grande parte desses polifenóis é composta de moléculas de massa molar elevada, como os taninos do tipo flavonol. Cerca de 20% dos polifenóis comuns são moléculas de massa molar baixa, como as proantocianidinas, ácidos fenólicos de carbono e flavonóis, que são glicosidicamente ligados a alguns açúcares [8]. A Figura 2.4 apresenta alguns dos flavonoides presentes no lúpulo.

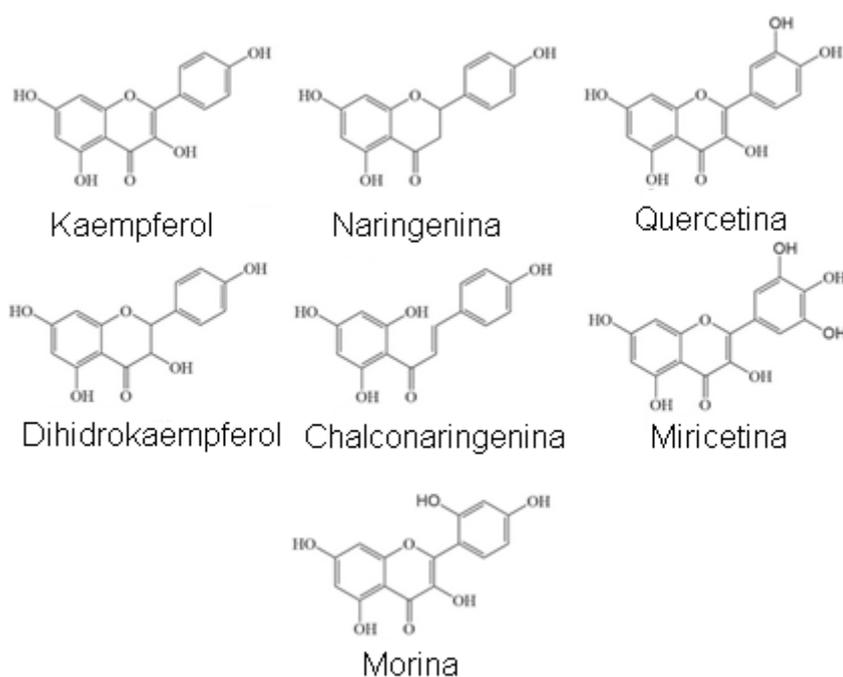


Figura 2.4 - Estrutura de alguns flavonoides presentes no lúpulo [18].

2.2. Legislação para produção e comercialização do lúpulo e cerveja

Com o crescimento do mercado cervejeiro artesanal no Brasil, houve um aumento do interesse da produção de lúpulo em território nacional ampliando assim a busca por matéria-prima de boa qualidade, uma vez que se

utiliza maior quantidade de lúpulo na produção de cervejas artesanais. Quase todo esse lúpulo era dependente de importação, no entanto, a fim de suprir essa necessidade, os produtores brasileiros empreenderam no cultivo de lúpulo no país [19].

A regularização da produção e comercialização do lúpulo é realizada perante o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que exige que todos os tipos e categorias de mudas de lúpulo sejam avaliadas para prosseguir em sua inscrição junto à plataforma de Registro Nacional de Sementes e Mudanças (RENASEM), visando a idoneidade dos elementos precursores do plantio.

A serviço do Sistema Nacional de Sementes e Mudanças, a Lei Federal nº 10.711/2003 discorre quanto à obrigatoriedade de registros, vistoria, inspeção e validação para a liberação de autorização do cultivo, manejo e comercialização de sementes e mudas. Caso algum produtor possua alguma não conformidade com a legislação, a produção torna-se ilegal e o órgão responsável, neste caso o MAPA, intervém aplicando multas, advertências e apreensão do material investido. Conseqüentemente, para a produção e comercialização do lúpulo, faz-se necessário verificar-se todos os requisitos e origens legais, a fim de garantir a qualidade dos produtos e evitar punições mediante a legislação vigente [20], [21].

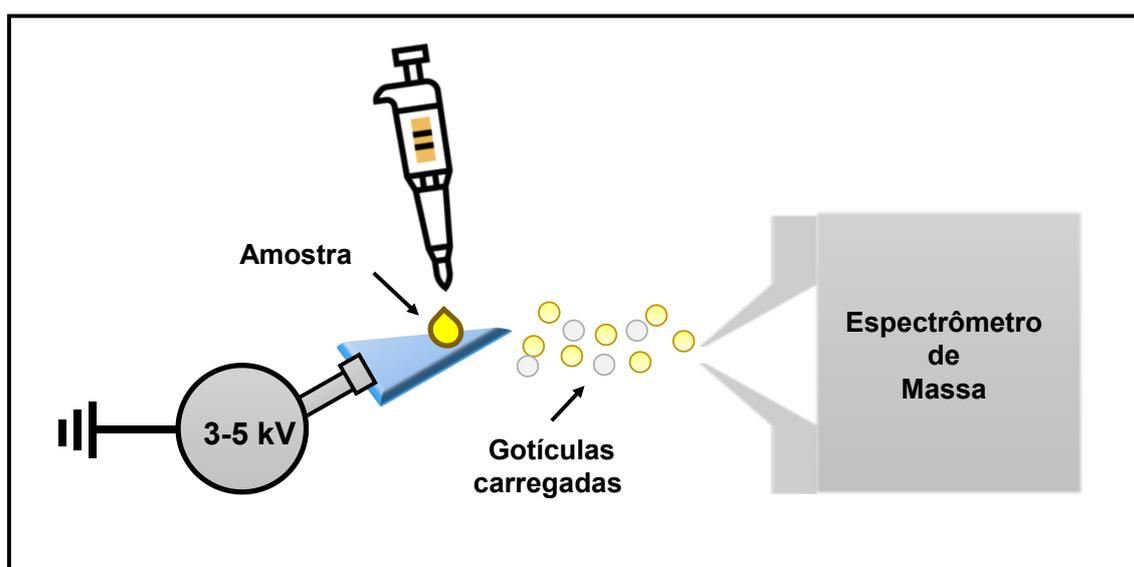
A partir da Resolução de diretoria colegiada (RDC) nº 42, de 29 de agosto de 2013, foi colocado um limite máximo para os teores de arsênio, chumbo e cádmio em cerveja. A concentração máxima de arsênio permitida é de $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$, para o chumbo essa concentração é de $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ e para o cádmio $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$. Esses valores, conforme indicados nessa resolução são fiscalizados pela agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) [22].

2.3. Espectrometria de massas por Paper Spray (PS-MS)

A ionização ambiente por Paper Spray é atualmente uma das técnicas de ionização de amostra à pressão ambiente mais utilizada no acoplamento com o espectrômetro de massas. Essa técnica foi proposta por Wang et al. e possui características similares a ionização por Eletrospray (ESI) [23]. Desde o início, a PS-MS tem sido amplamente utilizada para variados fins,

principalmente devido a sua simplicidade, eficiência e capacidade de analisar amostras complexas com um baixo ou até mesmo nenhum preparo de amostra [23]. Devido à alta sensibilidade da técnica de PS-MS mesmo para análise de matrizes complexas, esta é empregada em diversas áreas para determinação de compostos orgânicos, dentre eles, na análise de alimentos visando o controle de qualidade e/ou detecção de fraudes e adulterações [24].

A técnica PS-MS (Figura 2.5) consiste em utilizar um papel cromatográfico cortado em formato triangular, utilizado como substrato para a amostra, posicionado em frente à entrada do capilar do espectrômetro de massas. Após a inserção da amostra, uma diferença de potencial é aplicada entre o papel e a entrada do aparelho, proporcionando assim a formação de um spray de gotículas do solvente contendo os analitos ionizados devido ao acúmulo de cargas na extremidade do papel. A geração de íons na ionização por paper spray ocorre pelo mesmo mecanismo do ESI, entretanto, a grande diferença de potencial faz com que as gotículas formadas tenham um excesso de cargas, e devido às forças de repulsão eletrostática e a evaporação do solvente, o volume da gota diminui e se divide até restarem apenas íons derivados do analito. Semelhante ao ESI, o equipamento possibilita realizar a análise das moléculas em cargas positivas ou negativas [23].



Adaptado de Shi et al. 2015.

Figura 2.5 - Representação do funcionamento da técnica de PS-MS [25].

A metodologia empregada na ionização desempenha um papel fundamental na espectrometria de massas, uma vez que não existe uma técnica universal para ionizar todos os analitos para os diversos tipos de amostras. Nesse sentido, o método de ionização é escolhido conforme a estrutura química e os grupos funcionais encontrados na amostra. Uma ampla parte dos progressos de análises pela espectrometria de massas estão ligados aos avanços das técnicas de ionização [26].

Em comparação a PS-MS, existe um método bem similar conhecido como espectrometria de massa por spray em folha (LS-MS) sendo essa uma técnica ESI de ionização ambiente que requer pouca ou nenhuma preparação de amostra. O mecanismo de ionização e procedimento de análise é semelhante ao PS-MS. No LS-MS, a folha da amostra é cortada em triângulo, fixada com uma pinça jacaré de modo que a ponta da folha fique próxima da entrada do MS. Depois disso, uma pequena alíquota de solvente é aplicada na superfície da folha e posteriormente uma alta tensão que extrai e ioniza os analitos da folha [27], [28].

Considerando a análise de lúpulo por PS-MS e a Espectrometria de massas por spray em folha (LS-MS), apesar da semelhança de análise, cada técnica apresenta vantagens e limitações. A PS-MS pode ser usada quantitativamente, enquanto a LS-MS fornece apenas informações qualitativas. Por sua vez, LS-MS é uma técnica mais rápida e de fácil uso, possibilitando a aquisição de dados em questão de segundos, já a PS-MS, devido a preparação de amostras necessária para a extração dos componentes da folha, no caso do lúpulo por exemplo, torna essa técnica mais demorada [27].

Para análises por PS-MS, primeiramente triângulos de papel de diâmetros iguais devem ser cortados, posteriormente, o extrato da amostra é aplicado neste papel. O triângulo de papel deve ser fixado em uma posição exata e ideal em relação à entrada no espectrômetro de massas, e, posteriormente, o solvente de pulverização e a tensão são aplicados para ionizar os analitos do papel. Para análises por LS-MS, a depender da amostra, esta pode ser diretamente cortada e fixada em uma posição ideal em relação à entrada do espectrômetro de massas, e posteriormente o solvente de pulverização e uma alta voltagem são aplicados para ionizar os analitos da amostra com mínimo

tratamento. Mesmo diante da facilidade de uso da LS-MS, a técnica de PS-MS é consideravelmente mais reprodutível [27], motivo pelo qual a escolha da técnica de PS-MS para realização deste trabalho.

Os resultados apresentados pelo PS-MS geram um espectro de massas com diferentes valores dos íons obtidos com relações de razão massa-carga que são correspondentes a intensidade de sinal da amostra. No caso do lúpulo, tanto no modo positivo quanto no negativo eles ionizam bem, mas a preferência é que a análise seja realizada no modo negativo, pois no modo positivo tem-se uma tendência a formação de produtos ligados ao sódio nas análises de lúpulo, dificultando a identificação dos compostos [27]. Os sinais analíticos mais comuns de se encontrar no lúpulo tanto no modo positivo quanto no negativo são os das resinas de α -ácidos e β -ácidos (Figura 2.6).

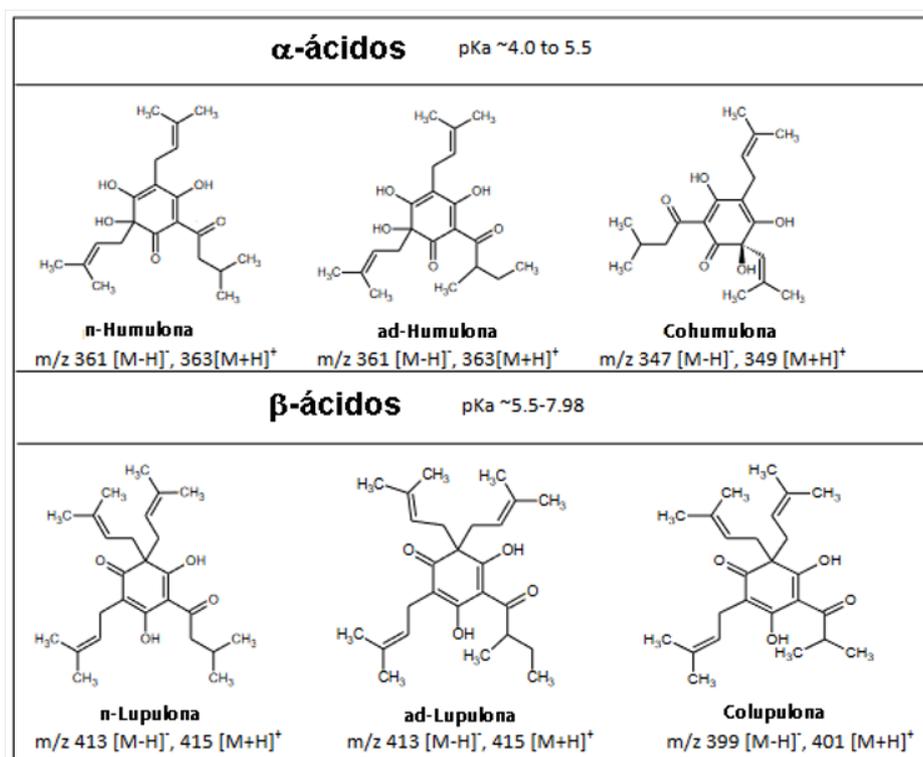


Figura 2.6 - Fórmulas dos principais α -ácidos e β -ácidos presentes no lúpulo e seus fragmentos nos modos positivo e negativo [27].

O uso de métodos capazes de identificar de maneira rápida e eficaz a presença de compostos orgânicos presentes no lúpulo contribui para a identificação dos compostos do lúpulo e conseqüentemente auxilia o cervejeiro

na elaboração de cervejas com maior confiabilidade e eficiência. No caso da técnica pela PS-MS, a identificação desses compostos se faz ainda mais viável pelo simples preparo de amostra comparado a outras técnicas. As Tabelas 2.2 e 2.3 apresentam ácidos que foram determinados no lúpulo utilizando o modo negativo e positivo, respectivamente, com a ionização por eletrospray a partir de uma infusão direta do extrato no massas.

Tabela 2.2 - Lista dos fragmentos de ácidos detectados pelo modo de íon negativo ESI em lúpulo, incluindo produtos de oxidação e degradação [27], [29].

Composto	Massa carga (m/z)	Fragmentos
Cohumulona ^a	347	329, 278
Humulona ^a	361	343, 292
Colupulona ^a	399	330, 287, 276, 262
Lupulona ^a	413	369, 344, 301, 276
Humulinona ^b	377	NA
Cohumulina ^b	363	NA
Adhumulinona ^b	377	NA
Oxidação da cohumulona ^b (2 O's)	379	NA
Oxidação da adhumulinona ^b	393	NA

NA: Não aplicável. ^a Adaptado de Blain K. 2012. ^b Adaptado de Negri et al. 2010.

Tabela 2.3 - Lista de polifenóis detectados pelo modo de íon negativo ESI em lúpulo [8], [27], [30].

Composto	Massa carga (m/z)	Fragmentos
Luteonina ^a	286	NA
Tecnocrocina ^a	268	NA
Xantohumol ^b	354	265, 247, 233, 119
Xantohumol B ^a	370	NA
Xantohumol D ^a	370	NA
Xantohumol E ^a	407	NA
Kaempferol-3-Rutinosídeo ^c	593	327, 284, 257
Kaempferol-3-Acetilhexosídeo ^c	490	327, 285, 284
Kaempferol-3-Hexosídeo ^c	447	327, 285, 284, 257

NA: Não aplicável. ^a Adaptado de Marova I. et al. 2012. ^b Adaptado de Blain K. 2012. ^c Adaptado de Magalhães P. et al. 2010.

2.4. Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS)

A espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente faz uso de um plasma indutivamente acoplado para ionizar os elementos de interesse presentes na amostra que será analisada, que são direcionados para o analisador de massa e, posteriormente detectados. Essa técnica foi desenvolvida por Houk et al. (1980) e é reconhecida por sua capacidade de detectar metais e vários não-metais em amostras líquidas em concentrações da ordem de partes por bilhão em massa, sendo considerada uma das técnicas mais sensíveis para análises elementares [10].

Para realizar as análises por ICP-MS, é fundamental uma preparação criteriosa da amostra, uma vez que estas são majoritariamente introduzidas na forma líquida, conseqüentemente, no caso de amostras sólidas, comumente é realizada a digestão ácida da amostra previamente à etapa de análise. Em relação aos procedimentos de digestão ácida, a otimização dos procedimentos considerando a redução da quantidade de reagentes e formação de resíduos tem sido avaliada em diferentes trabalhos [31]–[33], dentre eles, o emprego de ácidos diluídos para digestão de variados tipos de amostras com aquecimento em forno assistido por radiação micro-ondas [31]–[33].

As análises por ICP-MS permitem uma detecção ininterrupta, pois nos internos do equipamento, existe um bombeamento em vários estágios de vácuo separados por aberturas diferenciais, onde os íons criados no plasma de argônio são transmitidos pelo analisador de massa ao detector e contador. Dessa forma se faz possível que o analista aumente consideravelmente a frequência analítica [34].

A digestão de amostra utilizando soluções ácidas diluídas quando empregadas sob altas temperaturas tornam-se eficientes no processo de digestão da matéria orgânica, conforme relatado nos trabalhos de Bizzi et al. (2011) sobre a eficácia da digestão ácida assistida por radiação micro-ondas de

tecidos vegetais empregando soluções de ácido nítrico diluído e peróxido de hidrogênio [33].

Os métodos de digestão que utilizam baixo volume de ácido tornam-se mais eficientes com a adição de um agente oxidante. O peróxido de hidrogênio eleva o poder oxidante desta mistura, substituindo assim a necessidade do uso de ácidos concentrados [32], [33].

Um estudo do uso de peróxido de hidrogênio em procedimentos de digestão com frascos fechados foi proposto por Bizzi et al. (2014). Neste trabalho avaliou-se o desempenho das digestões utilizando-se peróxido de hidrogênio e pressurização do frasco reacional com O₂. A digestão de amostras orgânicas assistida por radiação micro-ondas em frascos fechados proporciona um gradiente de temperatura que possibilita a regeneração do ácido nítrico na presença de H₂O₂, possibilitando assim a decomposição da amostra em ácido diluído [31].

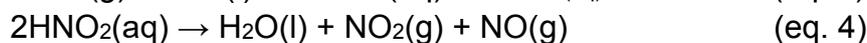
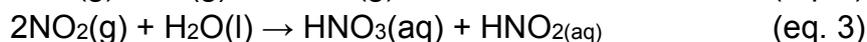
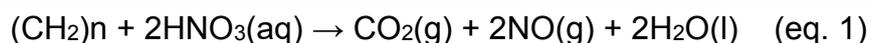


Figura 2.7 - Reações de regeneração de HNO₃ em frasco fechado com H₂O₂ [35].

A oxidação da matéria orgânica usando soluções diluídas de HNO₃ (eq. 1) está relacionado a uma série de reações que acontecem simultaneamente e levam a regeneração do ácido nítrico (eq. 2 a 4). O primeiro requisito para essas reações é uma quantidade suficiente de O₂ que deve estar presente na fase gasosa (eq. 2). Após a oxidação de NO(g) a NO₂(g), este último é absorvido pela solução e uma reação de desproporção ocorre produzindo HNO₃ e HNO₂ (eq. 3). O HNO₃ produzido pode reiniciar o ciclo de oxidação da matéria orgânica (eq. 1). Uma vez que a reação é realizada em frascos fechados, essa sequência de reações ocorrerá enquanto o O₂ estiver presente no frasco [35].

2.4.1. Estratégias de calibração em ICP-MS e interferências

Em relação aos métodos de calibração, as curvas analíticas são essenciais para se realizar determinações quantitativas usando métodos espectro analíticos. O método de calibração mais comum é o método de calibração externa, comumente aplicado para matrizes menos complexas. Entretanto, considerando matrizes complexas, as diferenças físicas e químicas entre as amostras e as soluções de referência podem causar efeitos de matriz e trazer resultados com baixa exatidão [36], [37]. Diversos métodos de calibração têm sido utilizados para corrigir esses efeitos matriciais durante as análises por ICP-MS, como por exemplo o uso de um padrão interno (padronização interna, IS) [38] e o método de adição de padrão [39], [40].

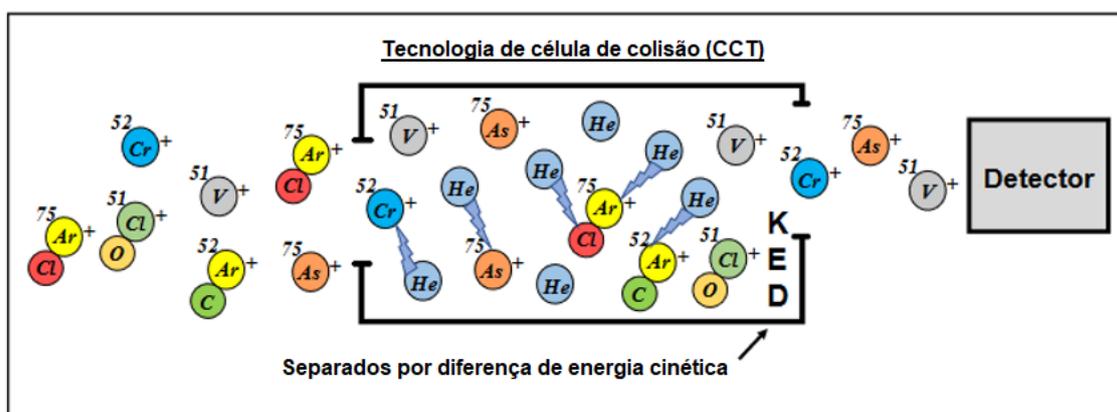
Para o método de calibração externa, a curva é construída traçando-se no eixo x a concentração do analito e no eixo y a intensidade de sinal (IS) obtida pelo equipamento. O valor de concentração do analito é obtido fazendo a relação de $C = (IS - b) a^{-1}$ onde b é a interseção da linha de regressão e a é a inclinação da reta. Por sua vez, em uma calibração por método de adição de padrão, o analito é adicionado à amostra em concentrações crescentes, assim, a construção da curva analítica é realizada no meio da amostra, corrigindo assim os efeitos de matriz. Realizar esse procedimento permite uma interação eficiente das matrizes, porém é considerado um método mais demorado e laborioso do que realizar uma calibração externa [36], [37].

Nesse sentido, a curva de calibração por IS é construída traçando a concentração do analito no eixo x e a relação sinal analito e sinal padrão interno no eixo y. O padrão interno também será inserido com concentração constante em todas as soluções branco, padrões e amostras. Assim, qualquer eventual degradação do desempenho analítico devido a um possível desvio do equipamento e na variação da introdução da amostra, sua eficiência será compensada [37].

Considerando a elevada sensibilidade e análise multielementar, a técnica de ICP-MS oferece vantagens para o uso em laboratório, porém uma desvantagem considerável são as interferências de massa, ou como podem também ser chamados, de interferências espectrais, causadas por espécies

poliatômicas com a mesma razão massa/carga, considerando as resoluções dos espectrômetros de massa de triplo quadrupolo. Como exemplo, o monitoramento dos isótopos $^{51}\text{V}^+$, $^{52}\text{Cr}^+$ e $^{75}\text{As}^+$, pode ser diretamente afetada pelos íons $^{38}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}^+$, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, dentre outros [41].

Para corrigir interferências poliatômicas neste tipo de equipamento, a tecnologia de célula de colisão (CCT), apresenta uma célula colocada antes do espectrômetro de massas. Essa célula pode ser preenchida por um gás inerte, geralmente hélio, que colide preferencialmente com espécies poliatômicas, uma vez que essas possuem diâmetro maior do que o analito. Dessa forma, os íons interferentes com baixa energia são rejeitados antes de chegarem ao detector pela ferramenta instrumental conhecida como discriminação por energia cinética (KED). Nesse sentido, os íons analitos que possuem maior energia cinética são detectados livre de interferência com sobreposição do sinal analítico. Isso gera uma correção eficaz das interferências poliatômicas eliminando a necessidade de gases reativos em análises rotineiras [41]. A figura 2.7 apresenta de maneira esquemática o funcionamento da célula de colisão realizando a correção de interferências poliatômicas por KED.



Adaptado de Pinheiro et al. 2019.

Figura 2.7 – Representação da célula de colisão removendo as interferências poliatômicas $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, para análise de $^{51}\text{V}^+$, $^{52}\text{Cr}^+$ e $^{75}\text{As}^+$ [38].

Em relação das análises utilizando CCT e KED, as medições são sequencialmente realizadas nos dois modos de aquisição, ou seja, no modo

padrão (STD), que é o modo sem o uso de gás na câmara de colisão e no modo de colisão. Geralmente, a sensibilidade é reduzida ao usar a célula de colisão baseada em KED, todavia, esta limitação não é muito considerável em comparação com a extraordinária sensibilidade do ICP-MS[41].

2.5. Quimiometria

A palavra quimiometria tornou-se popular na década de 70 e seu desenvolvimento se baseou na computação científica, envolvendo, em sua maioria, métodos estatísticos multivariados aplicados aos dados obtidos na química analítica. Na década de 80, a quimiometria foi organizada como uma disciplina, dando suporte ao surgimento das primeiras publicações, associações e cursos dedicados ao tema. Porém, foi na década de 90 que ela começou a se expandir em diversas áreas da química, especialmente na indústria farmacêutica. Devido à capacidade de instrumentos analíticos em adquirir grandes quantidades de dados de forma mais ágil e, associado ao aumento da capacidade de processamento dos equipamentos eletrônicos atuais, a quimiometria se consolidou como uma ferramenta indispensável para estudo e análise dos mais variados dados químicos [7].

A quimiometria pode ser definida como a disciplina que faz uso de diferentes métodos matemáticos e estatísticos visando planejar ou selecionar experimentos de forma ótima e para extrair o máximo de informação química a partir de dados analíticos obtidos em variados tipos de análise. Estas técnicas quimiométricas podem ser agrupadas em três grandes grupos: planejamento e otimização dos experimentos, calibração multivariada e reconhecimentos de padrões, sendo que esta última ainda pode ser subdividida em técnicas supervisionadas e não supervisionadas [6].

Métodos de agrupamento são usados para classificar objetos, caracterizados pelos valores de um conjunto de variáveis, em determinados grupos. A HCA é um exemplo de método de reconhecimento dos padrões não supervisionado. Com este método os objetos são agregados em diversas classificações de acordo com a semelhança de suas características em relação aos valores dos analitos obtidos. Seu objetivo é exibir os dados de forma a enfatizar sua natureza por um determinado conjunto e características padrões em

um espaço bidimensional. Esse conjunto descreve um grupo de objetos (amostras) que são mais semelhantes entre si do que com outras amostras fora do grupo. Os pontos correspondentes aos objetos são agrupados juntos com base em sua semelhança entre as amostras. Supõe-se que essa proximidade dos pontos no espaço reflete a similaridade de suas propriedades em comparação as outras amostras de outro grupo. Na HCA os resultados são apresentados na forma de dendrogramas, permitindo a visualização entre objetos ou suas variáveis [42].

Já a PCA visa a entrega de dados através de combinações lineares da variação original. A PCA decompõe uma matriz de dados X de posto n , como uma soma de matrizes de posto um. O posto indica o número de vetores linearmente independentes de uma matriz. Essas novas matrizes de rank um são os produtos vetoriais da pontuação destes vetores, t , e dos vetores de carregamento, p , como mostrado na equação:

$$X = t_1 p'_1 + t_2 p'_2 + \dots + t_n p_n$$

Esses vetores podem ser calculados por um ajuste de mínimos quadrados (decomposição de valor singular). As novas coordenadas do sistema chamadas de componentes principais (PC's) são mutuamente ortogonais, não correlacionados e explicam continuamente o máximo da variação residual. Normalmente, apenas as primeiras PC's representam a maior quantidade de dados totais desta variância e pode ser utilizado para representar o todo conjunto de dados de maneira mais simples [43].

Dessa forma, a PCA se demonstra como um método exploratório não supervisionado porque ajuda a elaborar hipóteses gerais a partir dos dados coletados. Sendo assim muito discrepante das estatísticas usadas para analisar experimentos planejados, que utiliza primeiramente teste de diversas hipóteses. O objetivo principal da exploração de análise é aprender com os dados sobre as diversas relações entre as variáveis e os objetos. Ao se fazer uso da PCA, é essencial observar que os vetores de pontuação fornecem a composição da componente principal relacionada aos objetos (amostras), enquanto os vetores de carregamento realizam essa mesma composição em relação às variáveis. Após a escolha do número de PC's, os dados podem ser projetados no novo espaço reduzido. Como as PC's são ortogonais e independentes, é possível investigar as diversas relações entre os objetos através dos gráficos de

pontuação das primeiras PC's e as inter-relações entre as variáveis através do respectivo carregamento das componentes. Esses gráficos gerados nessa análise dos componentes principais revelam informações úteis sobre as características estruturais dos dados [44].

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Desenvolver procedimentos analíticos para a determinação da composição elementar e orgânica em amostras de lúpulo (*Humulus lupulus*), provenientes de colheita regional e de amostras em pellets, utilizando a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) e a espectrometria de massas por paper spray com analisador de massas de baixa resolução (PS-MS).

3.2. Objetivos específicos

- Desenvolver procedimentos visando o preparo de amostras de lúpulos baseada na digestão assistida por radiação micro-ondas para a determinação de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V por ICP-MS;
- Otimizar os parâmetros instrumentais da técnica de ICP-MS para determinação simultânea de 10 elementos em amostras de lúpulo;
- Avaliar as figuras de mérito do método de quantificação dos componentes inorgânicos por ICP-MS;
- Otimizar os parâmetros instrumentais da técnica de PS-MS para a detecção de compostos orgânicos do lúpulo;
- Avaliar indicadores geográficos a partir do uso da quimiometria por PCA e HCA dos resultados obtidos para a composição das amostras analisadas.

Foram escolhidos estes dez elementos para análise via ICP-MS devido seu papel potencialmente tóxico para o ser humano e seus bons resultados nos testes realizados antes deste trabalho como indicadores geográficos.

4. Material e métodos

4.1. Amostras

Doze amostras de lúpulo de diversos países (oito amostras de origem internacional e quatro amostras de origem nacional) foram analisadas. As amostras nacionais foram obtidas diretamente dos produtores *in natura* e as amostras internacionais foram compradas na forma de pellets. Entre as quatro amostras de lúpulo cultivadas em solo brasileiro, a Galena, Chinook e Cascade são de origem estadunidense. Já a amostra Mantiqueira é um híbrido de outras espécies, cultivado na serra da Mantiqueira. Todas as amostras foram armazenadas em temperatura de aproximadamente -4 C° até serem analisadas. A Tabela 4.1 apresenta as amostras analisadas, o país de origem e suas características quanto ao sabor destinado ao produto.

Tabela 4.1 - Amostras de lúpulo analisadas, país de origem e características.

Amostra	Amostras de Lúpulo	País do plantio	Característica
Amostra 1	SAAZ	(CZE) 	Herbal e amadeirado
Amostra 2	Sladek	(CZE) 	Frutado e cítrico
Amostra 3	Galena	(USA) 	Cítrico e floral leve
Amostra 4	Chinook	(USA) 	Frutado e cítrico
Amostra 5	Zeus	(USA) 	Cítrico, picante e herbal
Amostra 6	Perle	(DEU) 	Cítrico
Amostra 7	Mittlefrueh	(DEU) 	Herbal
Amostra 8	Tradition	(DEU) 	Frutado e cítrico
Amostra 9	Galena (nac.)	(BRA) 	Cítrico e floral leve
Amostra 10	Mantiqueira	(BRA) 	Cítrico e floral leve
Amostra 11	Chinook (nac.)	(BRA) 	Frutado e cítrico
Amostra 12	Cascade (nac.)	(BRA) 	Cítrico e floral

Legenda: CZE - República Tcheca, USA - Estados Unidos da América, DEU - Alemanha, BRA - Brasil.

4.2. Instrumentação

- Espectrômetro de massas com analisador de massas de baixa resolução do tipo Ion Trap (Thermo Fisher, LCQ-Fleet, EUA);
- Estufa (Tecnal, TE-394/1, Piracicaba, Brasil);
- Balança analítica (Shimadzu, AUW220D, Kyoto, Japão);
- Centrífuga (Quimis®, modelo 50 0222E24 600 W São Paulo, Brasil);
- Sistema de purificação de água (Millipore Direct-Q 3, 18,2 M Ω cm, Merck, Alemanha);
- Sistema de purificação de ácido nítrico (DuoPUR, Milestone, Sorisole, Itália);
- Forno de micro-ondas com cavidade (Milestone ETHOS 1, Sorisole, Itália) equipado com rotor de alta pressão HPR-1000/10s e processador ultrassônico cup horn (modelo VCX 505, Sonic & Materials, EUA).

4.3. Reagentes e soluções

As vidrarias e frascos utilizados foram descontaminados em banho de ácido nítrico 10% v v⁻¹ por, no mínimo, 12 h. Em seguida, lavados com água deionizada e secos. Todos os experimentos foram preparados utilizando ácidos nítrico (Merck, Alemanha) destilados em um sistema de destilação DuoPUR (Milestone, Sorisole, Itália), peróxido de hidrogênio 30% v v⁻¹ (Merck, Alemanha) e água ultrapura (resistividade maior que 18,2 M Ω cm) obtida a partir do sistema de purificação de água (Millipore Direct-Q 3, Merck, Alemanha).

As soluções analíticas de calibração e os experimentos de adição e recuperação foram preparadas a partir de diluições de alíquotas de solução estoque monoelementar contendo 1000 mg L⁻¹ de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V (Fluka, Suíça) preparadas em HNO₃ 0,14 mol L⁻¹, bem como os padrões internos avaliados: Y e Ge (Fluka, Suíça). As concentrações utilizadas para a curva analítica de calibração dos analitos com exceção do cobre foram 0; 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 100 μ g L⁻¹ preparadas em HNO₃ 0,14 mol L⁻¹. Já para Cu a curva preparada foi a de 0,5; 1; 5; 10; 25; 50; 100; 200 μ g L⁻¹ devido a concentração deste nas amostras ser maior do que a dos outros elementos. Os

experimentos de adição e recuperação foram preparados em três níveis (1; 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Para as análises por PS-MS foram utilizados Metanol grau HPLC (J. T. Baker, Radnor, EUA), ácido fórmico (Sigma Aldrich, EUA) e papel de cromatografia (WHATMANtm, Marlborough, EUA) cortado a laser formando um triângulo equilátero com lado de 1,4 cm. Também foram utilizadas quatro soluções padrão de mirceno, humulona, linalool e geraniol (Fluka, Suíça).

4.4. Preparo de amostras

4.4.1. Preparo de amostra para as análises por ICP-MS - Digestão assistida por radiação micro-ondas

As amostras foram previamente trituradas manualmente em um cadinho de ágata e colocadas em um béquer. Posteriormente, os béqueres foram deixados na estufa a uma temperatura de 60°C por 18h. Após a secagem, em uma balança analítica (Shimadzu, AUW220D), 0,25g de cada amostra de lúpulo foi pesada em triplicata. Posteriormente, essa massa foi inserida em um frasco de digestão do forno de micro-ondas em uma mistura digestora constituída de 2,5 mL de água ultrapura, 3,5 mL de HNO₃ 14 mol L⁻¹ e 1,0 mL de H₂O₂ 30% v v⁻¹. Os frascos foram levados para a digestão sob um programa de aquecimento estabelecido em uma rampa de 10 minutos para se atingir a temperatura de 170 C° e um patamar sob a mesma temperatura por 20 minutos. Após um tempo de resfriamento de 30 minutos, os frascos foram abertos em uma capela de fluxo laminar e avolumadas em um tubo Falcon[®] graduado para 20 mL com água ultrapura. Anterior as análises por ICP-MS, os digeridos foram diluídos dez vezes para compatibilização com os requisitos adequados para leituras no equipamento.

4.4.2. Preparo de amostra para as análises por PS-MS

Para a otimização da análise por PS-MS, 0,025 g da amostra 12 (Cascade nacional) foi pesada em quadruplicata sendo cada replica tratada com

quatro soluções diferentes: (1) metanol e água ultrapura 1:1 v v⁻¹; (2) metanol 100% v v⁻¹; (3) ácido fórmico 1% v v⁻¹ e metanol 1:1 v v⁻¹; e (4) ácido fórmico 1% v v⁻¹. As amostras foram maceradas em um cadinho de ágata com 2 mL da respectiva solução e o líquido obtido foi coletado em um frasco eppendorf®. Posteriormente, os frascos foram centrifugados por 5 minutos e o líquido límpido foi coletado para a análise, desprezando-se o precipitado.

Após a otimização, pesou-se 0,025 mg de cada uma das quatro amostras escolhidas (Amostra 2, 3, 9 e 11) sendo que essas foram maceradas em um cadinho de ágata com 2 mL de ácido fórmico.

4.5. Análise das amostras

4.5.1. Determinação elementar por ICP-MS

A determinação de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V nas amostras de lúpulo foi realizada utilizando o espectrômetro de massa quadrupolar com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS 7700, Agilent Technology, Tóquio, Japão) em modo padrão e com cela de colisão utilizando He 99,995% (Air Liquide, Santo Amaro, Brasil) como gás colisional. A Tabela 4.2 apresenta a descrição dos parâmetros operacionais utilizados no ICP-MS.

Tabela 4.2 - Condições operacionais utilizadas no ICP-MS.

Parâmetro instrumental	Parâmetros
Potência de radiofrequência (kW)	1,55
Vazão do gás do plasma (L min ⁻¹)	15
Vazão do gás auxiliar (L min ⁻¹)	1,00
Vazão de nebulização (L min ⁻¹)	1,05
Profundidade de amostragem (mm)	8,0
Vazão de He na célula de colisão (mL min ⁻¹)	4,5
Tempo de integração (s)	3,0
Nebulizador	Micro-Mist
Câmara de nebulização	Scott type – double pass
Números de replicatas	3

Analitos	Isótopo (m/z)
Ag	109
As	75
Cd	114
Co	59
Cr	52
Cu	63
Ni	60
Pb	208
Sb	121
V	51
Padrões Internos Ge; Y	72; 89

4.5.2. Análise por PS-MS

Primeiramente a amostra 12 (Cascade nacional) foi analisada nas quatro soluções, descritas no item 4.4.2. depositando no papel quadriculado 10 µL do extrato preparado junto a 20 µL de metanol grau HPLC a uma distância de 3 mm entre o papel cromatográfico e o equipamento. Depois de avaliada que a solução 4 foi a melhor solução para o método, conforme será discutido no item 5.3, a amostra 12 com a solução 4 foi novamente analisada, com a distância de 5 mm entre a ponta do triângulo do papel e a entrada do equipamento. Após otimização, a distância de 3 mm foi escolhida para o método e as quatro amostras (amostra 2, 3, 9 e 11) foram então analisadas nessa condição. A Tabela 4.3 apresenta a descrição dos parâmetros operacionais utilizados no PS-MS.

Tabela 4.3 - Condições operacionais utilizadas no PS-MS.

Parâmetro instrumental	Parâmetros
Tensão da fonte modo positivo (kV)	4,0
Tensão da fonte modo negativo (kV)	-4,0
Tensão do capilar (V)	40
Temperatura do tubo de transferência	275
Tensão das lentes do tubo (V)	120

Faixa do espectro no modo positivo (m/z)	300 a 500
Faixa do espectro no modo negativo (m/z)	250 a 500
Volume da amostra (μL)	10
Volume de solvente [metanol] (μL)	20

5. Resultados e discussão

5.1. Determinações elementares em amostras de lúpulo por ICP-MS

5.1.1. Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O desempenho do equipamento ICP-MS foi avaliado para determinação de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V nas amostras de lúpulo empregando os modos de operação padrão sem gás de colisão (STD) e com cela de colisão (CCT) e discriminação por energia cinética (CC/He). Nas análises realizadas em modo CCT, a célula de colisão foi pressurizada com hélio na vazão de 4,5 mL min⁻¹.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados a partir de doze brancos analíticos do procedimento (réplicas autênticas). Os cálculos foram realizados conforme orientação do documento DOQ-CGCRE-008 elaborado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial [45].

$$LD = 3,3 s / b$$

$$LQ = 10 s / b$$

Sendo que *s* é o desvio padrão dos brancos analisados e *b* é o coeficiente angular das curvas de calibração. Na Tabela 5.1 são apresentados os isótopos, modo de aquisição, sensibilidade, coeficiente de determinação, LD e LQ para as análises dos dez analitos.

Tabela 5.1 – Parâmetros analíticos para a determinação de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V por ICP-MS.

Isótopo	Modo de aquisição	Sensibilidade ^a	R ²	LD µg g ⁻¹	LQ µg g ⁻¹
⁵¹ V	CC/He	1170	0,9995	0,00020	0,00067
⁵² Cr	CC/He	1233	0,9996	0,00087	0,00290
⁵⁹ Co	STD	6620	0,9998	0,00002	0,00006
⁶⁰ Ni	STD	1430	0,9996	0,00005	0,00017
⁶³ Cu	STD	3675	0,9997	0,00007	0,00022

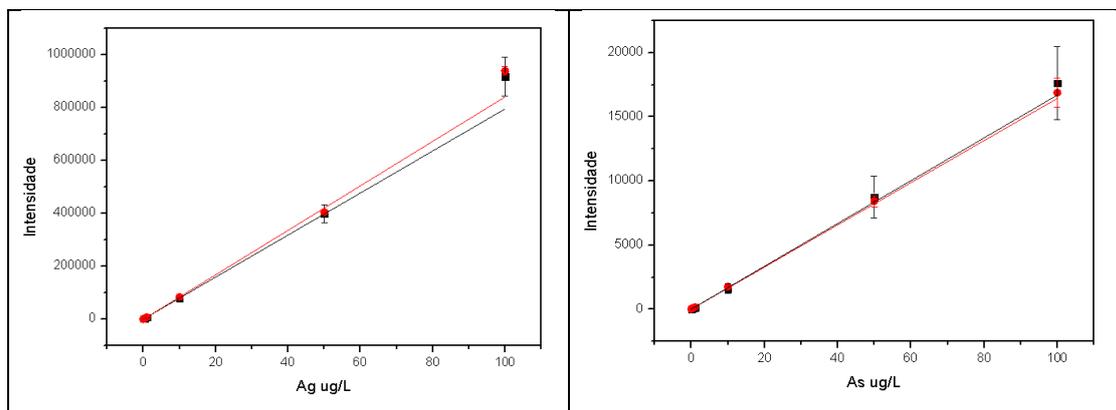
⁷⁵ As	CC/He	130	0,9991	0,00153	0,00510
¹⁰⁷ Ag	STD	6941	0,9998	0,00011	0,00036
¹¹⁴ Cd	STD	3325	0,9999	0,00010	0,00033
¹²¹ Sb	STD	6444	1,0000	0,00005	0,00017
²⁰⁸ Pb	STD	8261	0,9999	0,00024	0,00081

^a Coeficiente angular da curva analítica de calibração (contagens L s⁻¹ µg⁻¹).

5.1.2. Avaliação da exatidão

Para avaliação da linearidade foram preparadas curvas em triplicata, a fim de verificar o método conforme as normativas brasileiras [45]. A avaliação da efetividade do método foi realizada pelo teste F e pelo teste t de Student. Em relação aos resultados obtidos nas curvas em triplicata, não houve diferença estatística entre as triplicatas utilizando os testes F e t ao nível de 95% de confiança.

Para avaliar possíveis efeitos matriciais nas análises, as medidas foram realizadas empregando-se a calibração externa e a padronização interna, avaliando-se ítrio e germânio como padrões interno. Experimentos de adição e recuperação foram realizados para avaliar as exatidões empregando os dois métodos de calibração. A Figura 5.1 apresenta as curvas analíticas de calibração por padronização interna (Ge foi utilizado como padrão interno) em comparação com o uso apenas da calibração externa.



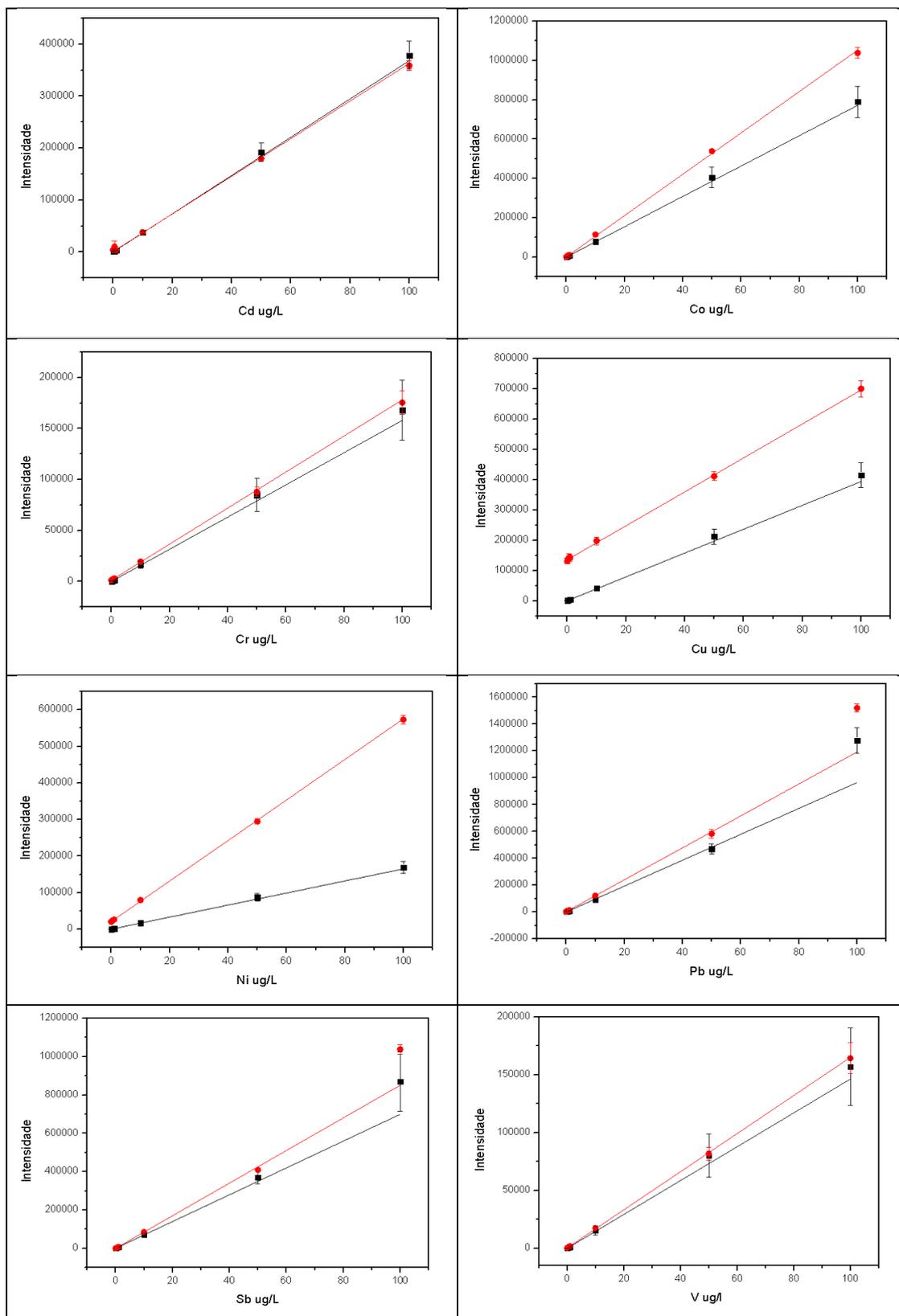


Figura 5.1 - Gráficos das curvas de calibração pelo método de calibração externa (■) e por padronização interna (■) para os analitos Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V.

A partir da comparação entre os coeficientes angulares obtidos para os gráficos utilizando calibração externa e padronização interna, pode-se observar que há diferença significativa entre os valores, considerando os nove analitos (teste F com 95% de confiança), com exceção apenas para cádmio. Porém, ao realizar o teste t com 95% de confiança para esse analito, houve uma diferença significativa ao nível avaliado. Dessa forma, foi possível comprovar que ocorreu um severo efeito matricial para todos os analitos e a padronização interna foi fundamental para garantir a precisão da análise.

Para avaliação da exatidão do procedimento foram realizados experimentos de adição e recuperação em duas amostras de lúpulo (Tradition e Chinook (nac.)) em três níveis de adição (1, 5 e 10 $\mu\text{g L}^{-1}$) para os dez analitos. Os padrões internos Y e Ge foram adicionados na concentração de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$. O cálculo de recuperação foi realizado conforme orientação do documento DOQ-CGCRE-008 [45] :

$$\text{Recuperação (\%)}: \text{Valor observado} * 100 / \text{Valor esperado}$$

Valores de recuperação entre 80% e 120% são considerados aceitáveis, classificando o procedimento validado [45]. No caso da avaliação do uso do padrão interno, foram calculados os valores de adição e recuperação sem o uso do padrão interno, com o uso de ítrio e, posteriormente, com o uso de germânio. A adição e recuperação sem o uso de padrão interno alcançou resultados entre 79% a 199%. Com o uso de ítrio como padrão interno os resultados ficaram entre 75% a 145% e com o germânio como padrão interno, as recuperações ficaram entre 80% a 119%. Logo, germânio foi empregado nas demais quantificações [45]. A Tabela 5.2 apresenta as recuperações obtidas para os experimentos de adição e recuperação considerando os modos de aquisição otimizados.

Tabela 5.2 - Experimento de recuperação para Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V ($\mu\text{g L}^{-1}$, média \pm desvio padrão, n = 3 e % de recuperação) por ICP-MS com o uso de germânio como padrão interno.

Isótopo	Valor adicionado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Amostras			
		Tradition (DE)		Chinook (BR)	
		Valor determinado	Recuperação	Valor determinado	Recuperação
^{51}V	0	$0,19 \pm 0,03$	-	$0,82 \pm 0,05$	-
	1	$1,1 \pm 0,2$	93	$1,3 \pm 0,1$	81
	5	$5,7 \pm 0,3$	110	$5,9 \pm 0,5$	107
	10	$11,4 \pm 0,3$	112	$10,0 \pm 0,5$	95
^{52}Cr	0	$0,6 \pm 0,2$	-	$0,78 \pm 0,07$	-
	1	$1,5 \pm 0,3$	93	$1,2 \pm 0,1$	80
	5	6 ± 2	117	$5,4 \pm 0,4$	99
	10	$11,7 \pm 0,5$	111	$9,7 \pm 0,6$	92
^{59}Co	0	$0,09 \pm 0,01$	-	$0,07 \pm 0,03$	-
	1	$1,11 \pm 0,07$	102	$1,2 \pm 0,1$	113
	5	$5,3 \pm 0,1$	105	$5,2 \pm 0,1$	103
	10	$11,0 \pm 0,8$	109	$10,6 \pm 0,3$	105
^{60}Ni	0	$1,51 \pm 0,06$	-	$1,01 \pm 0,07$	-
	1	$2,6 \pm 0,1$	106	$1,64 \pm 0,09$	100
	5	$7,2 \pm 0,5$	114	$5,6 \pm 0,2$	99
	10	$11,6 \pm 0,6$	101	$10,9 \pm 0,3$	102
^{63}Cu	0	$21,6 \pm 0,5$	-	$7,9 \pm 0,5$	-
	1	$23,2 \pm 0,8$	107	$6,4 \pm 0,5$	95
	5	27 ± 3	101	$10,4 \pm 0,4$	99
	10	$30,2 \pm 0,9$	85	$15,5 \pm 0,3$	101
^{75}As	0	$0,12 \pm 0,04$	-	$0,26 \pm 0,04$	-
	1	$1,3 \pm 0,7$	114	$1,06 \pm 0,07$	95
	5	$5,0 \pm 0,8$	97	$5,4 \pm 0,4$	105
	10	$11,3 \pm 0,3$	111	$10,6 \pm 0,5$	105
^{107}Ag	0	$0,12 \pm 0,09$	-	$0,3 \pm 0,1$	-
	1	$0,9 \pm 0,1$	82	$0,9 \pm 0,1$	80
	5	$4,8 \pm 0,1$	93	$4,9 \pm 0,2$	94
	10	$8,1 \pm 0,3$	80	$8,3 \pm 0,3$	82
^{114}Cd	0	< LQ	-	< LQ	-
	1	$0,92 \pm 0,09$	92	$0,92 \pm 0,05$	92
	5	$5,9 \pm 0,2$	119	$3,9 \pm 0,1$	80
	10	$9,6 \pm 0,7$	96	$8,6 \pm 0,4$	86
^{121}Sb	0	$0,04 \pm 0,03$	-	$0,08 \pm 0,02$	-

	1	0,94 ± 0,04	90	1,2 ± 0,2	118
	5	4,5 ± 0,1	89	4,3 ± 0,5	84
	10	9,66 ± 0,6	96	9,06 ± 0,3	90
	0	0,18 ± 0,06	-	0,30 ± 0,02	-
²⁰⁸ Pb	1	1,06 ± 0,06	88	1,0 ± 0,2	85
	5	5,1 ± 0,2	99	4,7 ± 0,3	91
	10	9,5 ± 0,6	93	8,7 ± 0,3	86

Recuperações satisfatórias (80 a 119%) foram obtidas para todos os analitos considerando as duas amostras empregadas nos experimentos de adição e recuperação. A análise de tendência e recuperação foi empregada na escolha do modo de aquisição e isótopo determinado para cada analito por ICP-MS. Preferencialmente, é vantajoso utilizar o modo sem gás de colisão visando uma maior sensibilidade (o sinal analítico é consideravelmente maior sem o uso da estratégia instrumental para correção de interferências espectrais) [41] e para reduzir custo de gás hélio. Mediante os analitos determinados, apenas os isótopos ⁷⁵As, ⁵²Cr e ⁵¹V apresentaram recuperações fora da faixa considerada aceitável quando analisadas utilizando o modo STD (sem gás de colisão). Conseqüentemente, esses analitos foram determinados em modo de colisão e os valores de recuperação obtidos utilizando o modo CC/He foram aceitáveis para os três analitos. Por sua vez, recuperações satisfatórias foram obtidas para ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁶³Cu, ¹⁰⁷Ag, ¹¹⁴Cd, ¹²¹Sb e ²⁰⁸Pb em modo STD.

5.1.3. Concentração dos elementos nas amostras de lúpulo por ICP-MS

A Tabela 5.3 apresenta as concentrações de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V determinadas nas doze amostras de lúpulo por ICP-MS.

Tabela 5.3 - Concentrações de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Sb e V ($\mu\text{g g}^{-1}$, média \pm desvio padrão, n = 3) determinadas nas amostras de lúpulo por ICP-MS.

Amostra	Ag	As	Cd	Co	Cr	Cu	Ni	Pb	Sb	V
SAAZ (CZ)	<LQ	0,14 \pm 0,01	<LQ	0,14 \pm 0,01	0,52 \pm 0,03	121 \pm 4	1,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2	0,031 \pm 0,004	0,23 \pm 0,01
Chinook (US)	<LQ	0,20 \pm 0,06	<LQ	0,33 \pm 0,01	0,80 \pm 0,08	4,8 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1	0,066 \pm 0,002	0,015 \pm 0,002	0,8 \pm 0,1
Galena (US)	<LQ	0,12 \pm 0,02	<LQ	0,18 \pm 0,01	0,50 \pm 0,07	7,2 \pm 0,4	1,7 \pm 0,2	<LQ	<LQ	0,61 \pm 0,04
Cascade (BR)	<LQ	0,06 \pm 0,02	<LQ	0,05 \pm 0,02	0,47 \pm 0,22	2,7 \pm 0,1	0,61 \pm 0,06	<LQ	0,027 \pm 0,009	0,41 \pm 0,04
Sladek (CZ)	<LQ	0,14 \pm 0,01	<LQ	0,13 \pm 0,01	0,8 \pm 0,1	57 \pm 16	1,6 \pm 0,1	0,28 \pm 0,04	0,06 \pm 0,02	0,40 \pm 0,03
Perle (DE)	<LQ	0,06 \pm 0,03	<LQ	0,055 \pm 0,004	0,36 \pm 0,05	33 \pm 4	1,5 \pm 0,1	<LQ	0,037 \pm 0,004	0,14 \pm 0,02
Mittlefrueh (DE)	<LQ	0,03 \pm 0,02	<LQ	0,049 \pm 0,001	0,5 \pm 0,2	99 \pm 4	2,0 \pm 0,3	<LQ	0,05 \pm 0,02	0,088 \pm 0,002
Galena (BR)	0,070 \pm 0,008	0,066 \pm 0,008	<LQ	0,030 \pm 0,008	0,4 \pm 0,1	3,0 \pm 0,2	0,49 \pm 0,07	0,52 \pm 0,20	0,04 \pm 0,03	0,33 \pm 0,04

Zeus (US)	<LQ	0,12 ± 0,03	<LQ	0,27 ± 0,02	0,9 ± 0,2	6,3 ± 0,2	1,9 ± 0,2	<LQ	0,017 ± 0,005	0,8 ± 0,1
Mantiqueira (BR)	0,20 ± 0,07	0,12 ± 0,05	<LQ	0,085 ± 0,005	0,9 ± 0,3	8,6 ± 2,5	0,77 ± 0,05	0,050 ± 0,010	0,05 ± 0,03	0,28 ± 0,02
Chinook (BR)	0,060 ± 0,001	0,09 ± 0,03	<LQ	0,03 ± 0,02	0,35 ± 0,03	4,4 ± 0,4	0,52 ± 0,06	0,020 ± 0,012	<LQ	0,39 ± 0,05
Tradition (DE)	<LQ	0,085 ± 0,003	0,5 ± 0,2	0,052 ± 0,002	0,5 ± 0,2	18 ± 1	1,6 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,019 ± 0,002	0,14 ± 0,03

Considerando que a média de uso de lúpulo é de 0,4 a 3 g por litro de cerveja [12], os resultados obtidos demonstraram que os valores das amostras de lúpulo estão enquadrados quanto aos teores dos elementos arsênio, cádmio e chumbo, considerando o lúpulo como o único responsável pela contaminação na cerveja. É esperado que a água, o malte ou outros componentes da cerveja podem também ser responsáveis por essa contaminação. Todavia, os valores das concentrações destes elementos na cerveja podem ser alterados pela composição de outros ingredientes e, dessa forma, uma análise de outros compostos se faz necessária para averiguar se a cerveja está enquadrada no atendimento da RDC nº 42, de 29 de agosto de 2013.

5.1.4. Análises quimiométricas dos resultados dos analitos inorgânicos por HCA e PCA

Os resultados encontrados para as concentrações dos analitos foram tratados por quimiometria, utilizando a análise hierárquica de agrupamento (HCA) para avaliar possíveis índices geográficos. Todas as análises quimiométricas apresentadas neste trabalho foram realizadas usando o programa Chemostat [46]. Para realizar essa análise, os dados foram autoescalados e o método foi aplicado a partir da distância Euclidiana com ligação completa conforme apresentado na Figura 5.2. Para auxiliar na interpretação dos grupos pela análise quimiométrica, as amostras de origem brasileira foram representadas pela cor verde, as amostras de origem estadunidense foram representadas pela cor vermelha, as tchecas pela cor azul e as alemãs pela cor amarela.

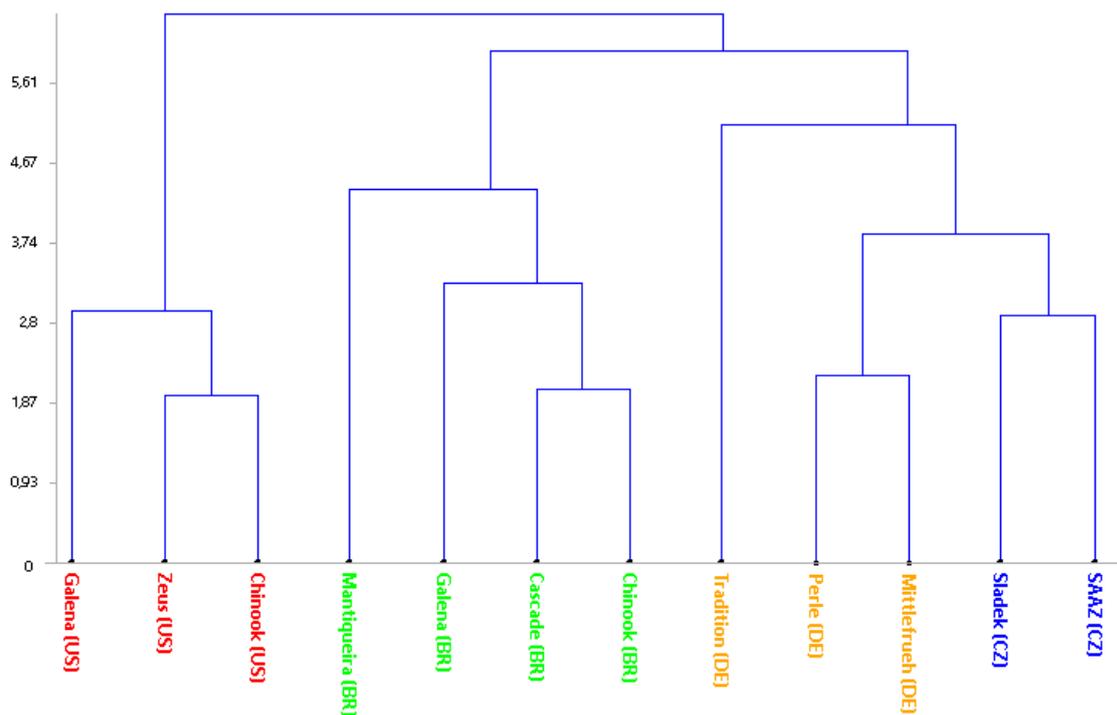


Figura 5.2 – HCA dos resultados de concentração dos analitos inorgânicos determinados por ICP-MS.

A Figura 5.2 apresenta os agrupamentos formados de acordo com a origem geográfica das amostras, demonstrando a capacidade da ferramenta quimiométrica. A amostra Tradition foi uma exceção, talvez pela similaridade e isso pode ser dada a distância geográfica e tipagem dos solos semelhantes às da República Tcheca e Alemanha. Além disso, as amostras Mittlefrueh e SAAZ são amostras com característica herbal marcante, enquanto a amostra Tradition, Perle e Sladek tem uma característica mais voltada ao cítrico, o que pode ter ocasionado o não agrupamento da amostra Tradition diretamente com as amostras alemãs. Outro fator importante é que um baixo número de analitos pode dificultar a eficiência do método e a análise destes indicadores geográficos.

Os resultados por ICP-MS também foram tratados pela análise dos componentes principais (PCA) para fazer as mesmas observações em função das similaridades das amostras. Para realizar a PCA, os dados foram autoescalados. Na Figura 5.3 está apresentado o resultado de escores da PCA com duas componentes principais com as amostras separadas em seus grupos por cores assim como na análise por HCA.

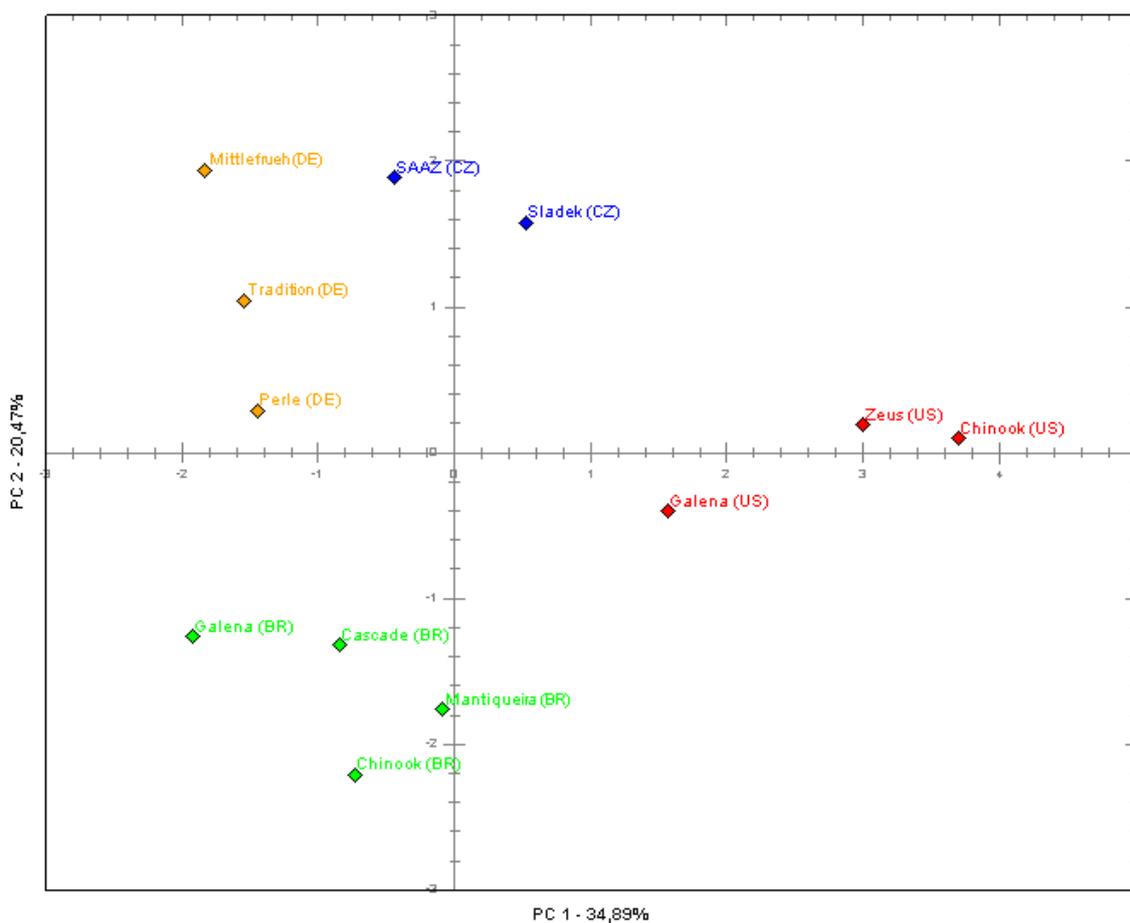


Figura 5.3 - PCA dos resultados de concentração dos analitos inorgânicos determinados por ICP-MS.

A partir dos dados foi possível observar que as duas primeiras componentes principais foram capazes de explicar 55,36% da variância total para os analitos. Além disso, os dados ficaram bem separados conforme sua origem. A partir da Figura 5.4 do gráfico biplot obtido também pela técnica, podemos observar como cada um destes analitos interferiram no posicionamento das amostras na PCA.

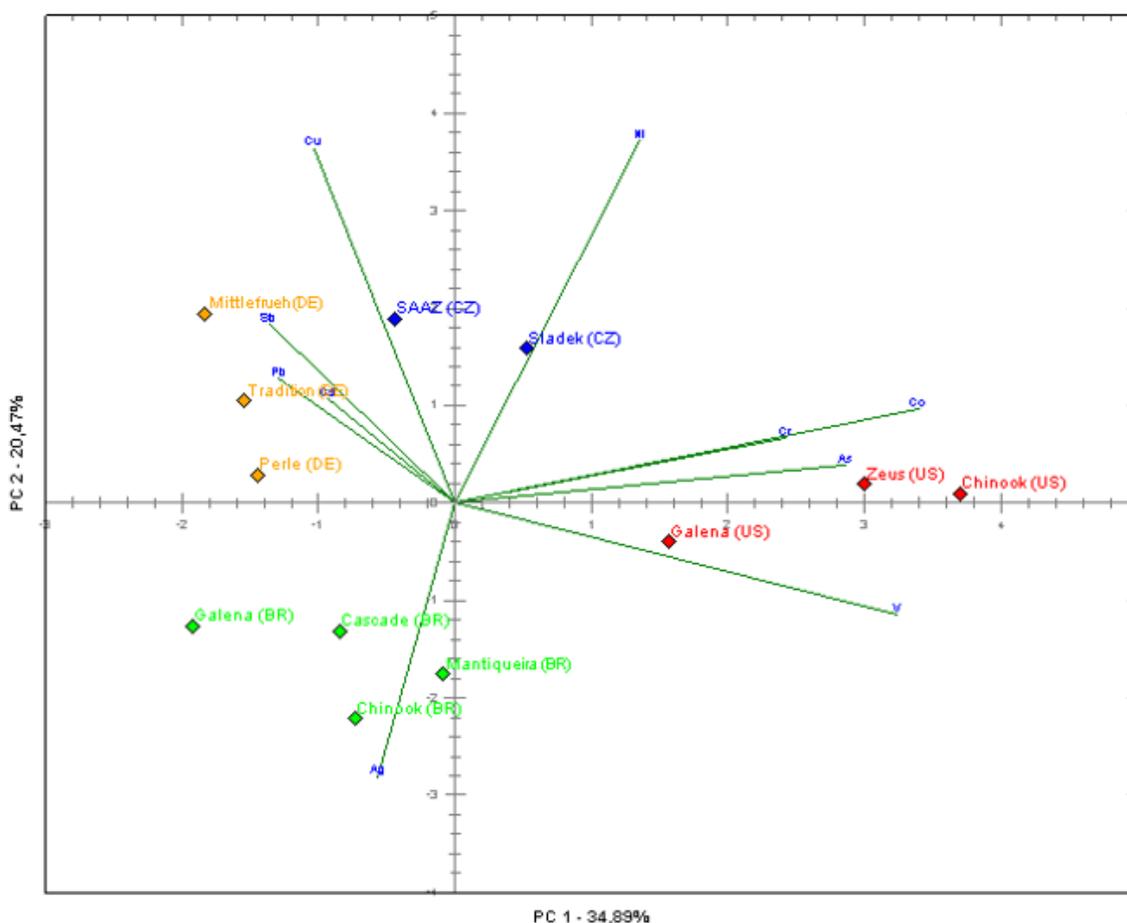


Figura 5.4 - Gráfico biplot da PCA dos resultados de concentração dos analitos inorgânicos determinados por ICP-MS.

A partir do gráfico biplot (Figura 5.4) e pelo gráfico de loading da PC1 e PC2 (Figura S.6 e Figura S.7) foi possível observar que os analitos Co, Cr, As e V foram responsáveis para posicionar as amostras estadunidenses mais próximas do lado direito da PCA. Para as amostras brasileiras, a Ag separou as amostras na parte mais baixa da PCA. As amostras alemãs ficaram na região mais à direita do gráfico devido as maiores concentrações de Pb, Sb e Cd. Por fim, as amostras tchecas foram definidas na parte superior central do gráfico pelos teores de Ni e Cu, sendo que sua proximidade com as amostras alemãs foi considerável devido ao teor de Cu. O gráfico biplot demonstra como cada analito contribui para os indicadores geográficos na determinação da origem das amostras.

5.2. Detecção de compostos orgânicos nas amostras de lúpulo por PS-MS

5.2.1. Testes de otimização

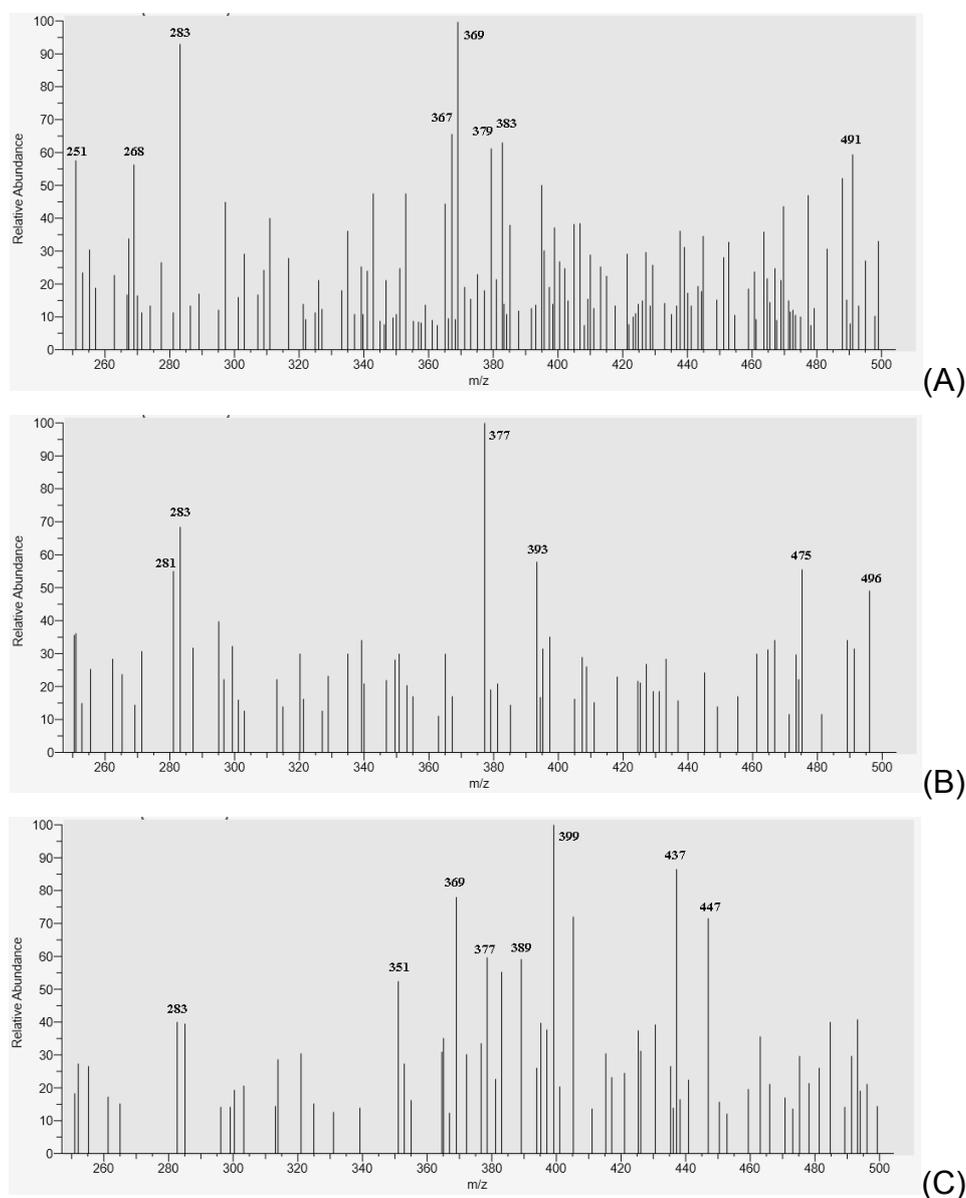
Para realizar a avaliação do procedimento conforme orientação do documento DOQ-CGCRE-008 [45] realizou-se avaliação de seletividade e limite de detecção do equipamento para garantir a reprodutibilidade deste procedimento via PS-MS como uma análise qualitativa.

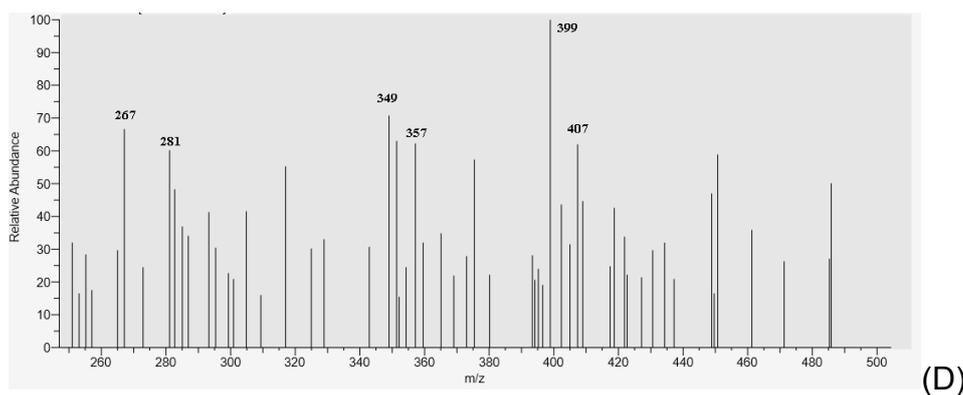
A otimização a partir das quatro soluções avaliadas: (1) metanol e água ultrapura 1:1 v v⁻¹; (2) metanol 100% v v⁻¹; (3) ácido fórmico 1% v v⁻¹ e metanol 1:1 v v⁻¹; e (4) ácido fórmico 1% v v⁻¹ ocorreu conforme citado no preparo de amostra no item 4.4.2. Nestes quatro procedimentos empregados no preparo da amostra 12 analisou-se em qual solução os íons no espectro de massa seriam mais intensos e em qual destes haveria íons semelhantes aos listados nas referências bibliográficas citadas nas Tabela 2.2. e 2.3. Em seguida foi feito um teste comparando-se os espectros de massas obtidos com distância entre o papel cromatográfico e o equipamento em 3 e 5 mm. Para determinação do limite de detecção (LD), as relações massa/carga de baixa intensidade foram desprezadas.

Um teste prévio com quatro soluções diferentes e o teste com duas distâncias diferentes entre o papel cromatográfico e o equipamento auxiliou para analisar com quais parâmetros o método ficaria mais eficaz. A análise via PS-MS no modo negativo foi realizada com todas as soluções obtidas a partir do lúpulo macerado com as amostras citadas no item 4.5.2, em uma varredura de 250-500 m/z. A partir dos dados coletados nas Figuras suplementares S1, S2, S3, S4 foi possível observar que a solução 1, 2 e 3 não apresentaram sinais de elevada intensidade. Para a solução 4, os íons de interesse no lúpulo, como o 369 m/z e o 413 m/z, que indicam a presença da lupulona [27], foram mais intensos. Desta forma, a solução 4 foi escolhida para tratar as outras amostras em suas análises. Em relação a distância do papel ao equipamento, as Figuras suplementares S4 e S5 demonstraram que a distância de 3 mm foi escolhida por apresentar melhores intensidades dos sinais.

5.2.2. Avaliação dos espectros no modo negativo por PS-MS

As amostras foram analisadas por PS-MS utilizando a solução de ácido fórmico 1% v v⁻¹ e uma distância entre o papel de amostragem e o equipamento de 3 mm conforme resultado da otimização realizada. Durante a análise, foi observado que os íons mais intensos no modo negativo foram verificados na faixa de 250-500 m/z. Conseqüentemente, as quatro amostras foram analisadas sob estas condições e os espectros são representados na Figura 5.5.





Fonte: Dados do próprio autor. Obtido do FreeStyle [47] (Thermo Fisher Scientific)

Figura 5.5 - Espectro de massas das amostras (A) SAAZ, (B) Galena, (C) Galena nac., (D) Chinook nac. no modo negativo na faixa de 250-500 m/z.

Para avaliar melhor cada uma das amostras foi elaborada a Tabela 5.4 a partir dos íons de interesse nas faixas obtidas entre 250-500 m/z no modo negativo.

Tabela 5.4 - Fragmentos analisados nas amostras de lúpulo usando o modo negativo.

Íon	Fragmento	Amostras	m/z	Referência
1	$[M - H - C_6H_8O]^-$	A	251	[15], [48]
2	$[M - H - CO_2]^-$	D	267	[49], [50]
3	$[M - H]^-$	A	268	[15], [27]
4	$[M - H]^-$	B e D	281	[27], [51], [52]
5	$[M - H]^-$	A, B e C	283	[27], [51], [52]
6	$[M - H]^-$	D	349	[53]
7	$[M - H]^-$	C	351	[54]
8	$[M - H]^-$	D	357	[54]
9	$[M - H]^-$	A	367	[55]
10	$[M - H - CO_2]^-$	A e C	369	[15], [27]
11	$[M - H]^-$	B e C	377	[15], [27], [29]
12	$[M - H]^-$	A	379	[15], [27], [29]
13	$[M - H]^-$	A	383	[55]

14	$[M - H]^-$	C	389	[56]
15	$[M - H]^-$	B	393	[15], [27], [29]
16	$[M - H]^-$	C e D	399	[15], [27], [29]
17	$[M - H]^-$	D	407	[27], [30]
18	$[M - H - H_2O]^-$	C	437	[57], [58]
19	$[M - H]^-$	C	447	[8], [27]
20	$[M - H]^-$	B	475	[54]
21	$[M - H]^-$	A	491	[54]
22	$[M - H]^-$	B	496	[55]

Nesse trabalho, todos os fragmentos foram possivelmente identificados baseando-se em dados da literatura. O íon 1 foi identificado como o fragmento $[M - H - C_6H_8O]^-$ da isocohumulona, conforme apresentado por Česlová L. et al. (2009) [48], sendo conhecido como um composto iso-alfa-ácido que contribui para o amargor da cerveja [15].

O íon 2 foi identificado como o fragmento $[M - H - CO_2]^-$ do ácido eicosanóico. Conforme apresentado por Simirgiotis M. et al. (2015) [49] e Stavri M. et al. (2004) [50] o ácido eicosanóico é encontrado em espécies de lúpulo.

O íon 3 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ da tecnocrocina. Conforme apresentado por Marova I. et al. (2011) [30] e Blain K. (2012) [27], a tecnocrocina é um polifenol da classe dos flavonóis.

O íon 4 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ do ácido oleico conforme apresentado por Demireva Z. et al. (1995) [51] e Kraemer M. et al. [52] (2022) Este composto é um ácido graxo encontrado no lúpulo [27].

O íon 5 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ do ácido esteárico conforme apresentado por Demireva Z. (1995) [51] e Kraemer M. et al. [52] (2022). Este composto, assim como o ácido oleico mencionado anteriormente é um ácido graxo encontrado no lúpulo [27].

O íon 6 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ do 19R-hydroxy-PGB2 conforme apresentado por Hughey C. et al. (2016) [53].

O íon 7 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ do xantohumul C conforme apresentado por Dresel. M. et al. (2016) [54]. Este composto pertence ao grupo das chalconas e é uma das resinas encontradas em espécies de lúpulo.

O íon 8 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ do 1-O- β -D-(2-metilpropanoil)-floroglucinol-glucopiranosídeo conforme apresentado por Dresel. M. et al. (2016) [54].

O íon 9 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ do Ácido 3-feruloilquínico conforme apresentado por Cheiran. K. (2018) [55].

O íon 10 foi identificado como o fragmento $[M - H - CO_2]^-$ da lupulona conforme apresentado por Blain K. (2012) [27]. Este composto é um beta-ácido de grande importância para a fabricação da cerveja. [15].

O íon 11 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ da humulinona conforme apresentado por Negri G. et al. (2010) [29] e Blain K. (2012) [27]. Este composto é um alfa-ácido de grande importância para a fabricação da cerveja. [15].

O íon 12 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ da oxidação da cohumulona (2 O's) conforme apresentado por Negri G. et al. (2010) [29] e Blain K. (2012) [15], [27].

O íon 13 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ do isofraxidin glicosídeo I conforme apresentado por Cheiran K. (2018) [55].

O íon 14 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ do piceid conforme apresentado por Rada P. (2017) [56].

O íon 15 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ da oxidação da adhumulinona conforme apresentado por Negri G. et al. (2010) [29] e Blain K. (2012) [27]. Este composto, assim como o fragmento 11 é um alfa-ácido de grande importância para a fabricação da cerveja. [15].

O íon 16 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ da colupulona conforme apresentado por Negri G. et al. (2010) [29] e Blain K. (2012) [27]. Este composto, assim como o fragmento 10 é um beta-ácido de grande importância para a fabricação da cerveja. [15].

O íon 17 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ do xantohumul E conforme apresentado por Marova I. et al. (2011) [30] e Blain K. (2012) [27]. Este composto pertence ao grupo das chalconas, assim como o composto 7 e é uma das resinas encontradas em espécies de lúpulo.

O íon 18 foi identificado como o fragmento $[M - H - H_2O]^-$ do Viniferifuran pesquisado no Pubchem. Compostos similares em lúpulo como o

Viniferin já foram encontrados como no trabalho de Jercovik V. e Collin S. (2008) [57]. É bem provável que o viniferifuran sofreu mecanismo similar ao viniferin perdendo a água e gerando o fragmento $[M - H - H_2O]^-$. [58].

O íon 19 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ do kaempferol-3-hexosídeo conforme apresentado por Magalhães P. et al. (2010) [8] e Blain K. (2012) [27]. Este composto é um polifenol que pertence a classe dos flavonóides glicosídeos.

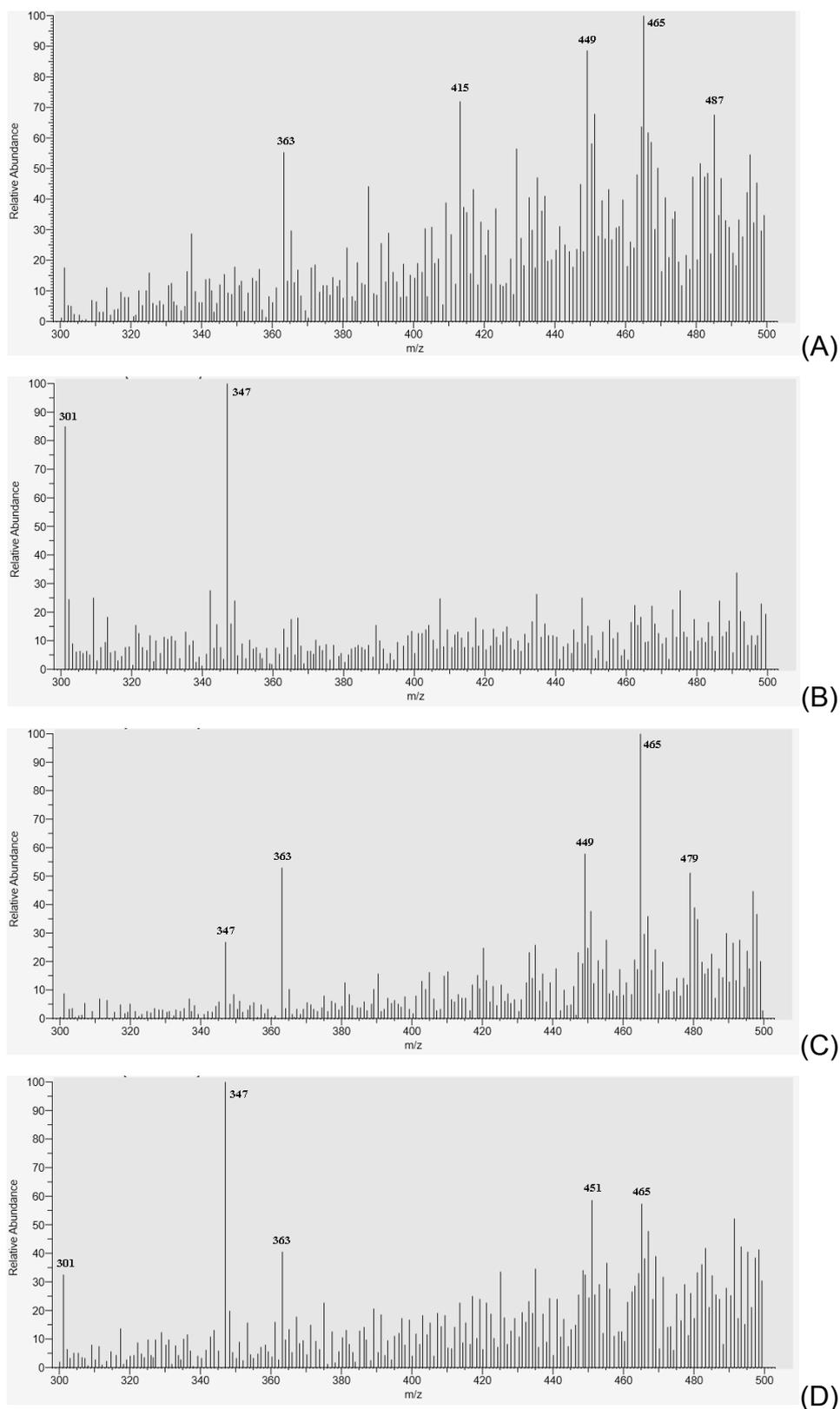
O íon 20 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ do isoxantholupona conforme apresentado por Dresel M. et al. (2016) [54]. Este composto é uma resina derivada do xantohumol.

O íon 21 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ do isorhamnetina glucuronídeo conforme apresentado por Rada P. (2017) [56].

O íon 22 foi identificado como o fragmento $[M - H]^-$ da Di-feruloilespermidina conforme apresentado por Cheiran K. (2018) [55].

5.2.3. Avaliação dos espectros no modo positivo por PS-MS

Depois das análises no modo negativo, também foi realizada uma análise com a solução 4 no modo positivo com a varredura de 100-1000 m/z. Nessa análise foi possível observar que os íons mais intensos foram verificados na faixa de 300-500 m/z. Desta forma, fez-se as análises das quatro amostras no modo positivo na faixa de 300-500 m/z obtendo-se os espectros de massa da Figura 5.6 e elaborada a Tabela 5.5 com os íons de interesse analisados.



Fonte: Dados do próprio autor. Obtido do FreeStyle [47] (Thermo Fisher Scientific)

Figura 5.6 - Espectro de massas das amostras (A) SAAZ, (B) Galena, (C) Galena nac., (D) Chinook nac. no modo positivo a faixa de 300-500 m/z

Tabela 5.5 - Fragmentos analisados das amostras no modo positivo.

Íon	Fragmento	Amostras	m/z	Referência
23	$[M + H]^+$	B e D	301	[59]
24	$[M + H - C_5H_8]^+$	B, C e D	347	[15], [60]
25	$[M + H]^+$	A, C e D	363	[15], [27]
26	$[M + H]^+$	A	415	[27], [60]
27	$[M + H]^+$	A e C	449	[55]
28	$[M + H]^+$	D	451	[61]
29	$[M + H]^+$	A, C e D	465	[27], [62]
30	$[M + H]^+$	C	479	[8], [27]
31	$[M + Na]^+$	A	487	[27], [62]

O íon 23 foi identificado como o fragmento $[M + H]^+$ da 4',6'-Di-O-metilchalconaringenina conforme apresentado por Stevens J. et al. (2000) [59]. Este composto é uma chalcona encontrada no lúpulo.

O íon 24 foi identificado como o fragmento $[M + H - C_5H_8]^+$ da lupulona conforme apresentado por Zhang X. et al. (2004) [60]. Este composto que no modo negativo foi identificado no fragmento 10 é um beta-ácido de grande importância na fabricação da cerveja. [15].

O íon 25 foi identificado como o fragmento $[M + H]^+$ da humulona conforme apresentado por Blain K. (2012) [27]. Este composto é um alfa-ácido de grande importância para a fabricação da cerveja. [15].

O íon 26 foi identificado como o fragmento $[M + H]^+$ da lupulona conforme apresentado por Blain K. (2012) [27] e Zhang X. et al. (2004) [60]. Este composto é um beta-ácido de grande importância para a fabricação da cerveja.

O íon 27 foi identificado como o fragmento $[M + H]^+$ do Kaempferol-3-O-hexosídeo conforme apresentado por Cheiran K. (2018). [55].

O íon 28 foi identificado como o fragmento $[M + H]^+$ do Myricetin 3-O-arabinosídeo conforme apresentado por Tang J. et al. (2020) [61]. Este composto é um flavonol encontrado no zimbro.

O íon 29 foi identificado como o fragmento $[M + H]^+$ da quercetina-3-glucosídeo. Uma vez que o fragmento $[M - H]^-$ deste composto possui m/z de 463 conforme Blain K. (2012) [27] e se for possível sua fragmentação no modo

positivo de forma $[M+H]^+$, o m/z deste fragmento seria de 465, correspondendo ao encontrado para o fragmento 29. Este fragmento $[M + H]^+$ também foi encontrado no trabalho de Maietti A. et al. (2017). [62].

O íon 30 foi identificado como o fragmento $[M + H]^+$ da quercetina 3'-O-glucuronídeo conforme apresentado por Tang J. et al. (2020). Este composto, assim como o composto 28 é um flavonol encontrado no zimbro. Muitos tipos de quercetina são comumente encontrados no lúpulo conforme citados nos trabalhos de Magalhães P. et al. (2010) [8] e Blain K.(2012) [27], o que amplia os indícios.

O íon 31 foi identificado como o fragmento $[M + Na]^+$ do quercetina-3-O-glucosídeo conforme apresentado por Maietti A. et al. (2017) [62]. Conforme já citado no trabalho de Blain K. (2012) [27] é comum que no modo positivo ocorra casos de interação com sódio durante ionização das amostras.

Com os resultados obtidos de fazendo uso da técnica de PS-MS foi possível observar que muitos analitos puderam ser observados qualitativamente, o que poderia ajudar muitas indústrias cervejeiras no reconhecimento de sua matéria prima de forma rápida para garantir a qualidade do produto final. Por ser uma análise qualitativa não seria possível realizar uma HCA ou PCA nos dados adquiridos na técnica.

6. Conclusão

A realização deste trabalho possibilitou o desenvolvimento de procedimentos analíticos utilizando as técnicas de ICP-MS e PS-MS para se determinar a composição de alguns elementos presentes no lúpulo com a análise quantitativa e qualitativa, identificando possíveis moléculas orgânicas do lúpulo. Os procedimentos de preparo de amostras realizados para a quantificação e identificação dos analitos inorgânicos e orgânicos, respectivamente, foram eficientes e levaram a resultados de elevada precisão e exatidão.

A avaliação de algumas figuras de mérito, segundo a normativa do INMETRO (DOQ-CGCRE-008) para o método desenvolvido por ICP-MS, apresentou boa seletividade, limites de detecção e de quantificação compatíveis para a determinação, e satisfatória recuperação para todos os analitos. As análises por PS-MS também apresentaram boa seletividade, avaliado a partir do branco utilizado nas análises, através da verificação de ruídos nos íons do espectro de massas e o uso de diferentes soluções teste para otimizar a eficiência da técnica.

As ferramentas quimiométricas HCA e PCA foram aplicadas para discriminação da origem das amostras em função das concentrações dos analitos. Os indicadores geográficos possibilitaram a separação e/ou agrupamento das amostras de lúpulo.

As amostras foram efetivamente separadas conforme seu país de origem e os compostos orgânicos identificados por PS-MS, somados aos resultados das concentrações elementares, contribuíram para avaliar a cerveja e para fornecer ao seu elaborador, parâmetros que podem qualificar o produto.

Referências bibliográficas

- [1] Organização Mundial da Saúde (OMS), “Relatório Global sobre Álcool e Saúde,” Genebra, Suíça, 2018.
- [2] H. J. Li and M. L. Deinzer, “Structural identification and distribution of proanthocyanidins in 13 different hops,” *J Agric Food Chem*, vol. 54, no. 11, pp. 4048–4056, May 2006, doi: 10.1021/jf060395r.
- [3] R. Barth, “The chemistry of beer,” 2013.
- [4] R. S. Durello, L. M. Silva, and S. Bogusz, “Hop Chemistry,” *Quim Nova*, vol. 42, no. 8, pp. 900–919, 2019, doi: 10.21577/0100-4042.20170412.
- [5] D. M. A. M. Luykx and S. M. van Ruth, “An overview of analytical methods for determining the geographical origin of food products,” *Food Chemistry*, vol. 107, no. 2, pp. 897–911, Mar. 15, 2008. doi: 10.1016/j.foodchem.2007.09.038.
- [6] M. M. C. Ferreira, *QUIMIOMETRIA: Conceitos Métodos e Aplicações*, vol. 1. Campinas: Editora UNICAMP, 2015.
- [7] R. G. Brereton, “Chemometrics for Pattern Recognition,” 2009.
- [8] P. J. Magalhães, J. S. Vieira, L. M. Gonçalves, J. G. Pacheco, L. F. Guido, and A. A. Barros, “Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray tandem mass spectrometry,” *J Chromatogr A*, vol. 1217, no. 19, pp. 3258–3268, May 2010, doi: 10.1016/j.chroma.2009.10.068.
- [9] Z. Liu, Y. Wang, and Y. Liu, “Geographical origins and varieties identification of hops (*Humulus lupulus* L.) by multi-metal elements fingerprinting and the relationships with functional ingredients,” *Food Chem*, vol. 289, pp. 522–530, Aug. 2019, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.03.099.
- [10] F. Cubadda, “Inductively coupled plasma mass spectrometry,” 2007.
- [11] E. Hoffman and V. Stroobant, *Mass Spectrometry - Principles and Applications*, Third Edition. British Library, 2007.
- [12] Opa Bier, “Ingredientes das cervejas especiais Parte 1: Lúpulo,” 2022.
- [13] C. Almaguer, C. Schönberger, M. Gastl, E. K. Arendt, and T. Becker, “*Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review,” *Journal of the*

- Institute of Brewing*, vol. 120, no. 4, pp. 289–314, 2014, doi: 10.1002/jib.160.
- [14] Y. Okada and K. Ito, “Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.),” *Biosci Biotechnol Biochem*, vol. 65, no. 1, pp. 150–155, Jan. 2001, doi: 10.1271/bbb.65.150.
- [15] M. Verzele and D. de Keukeleire, *Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids*. Elsevier, 1991.
- [16] M. Karabín, T. Hudcová, L. Jelínek, and P. Dostálek, “Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use,” *Compr Rev Food Sci Food Saf*, vol. 15, no. 3, pp. 542–567, May 2016, doi: 10.1111/1541-4337.12201.
- [17] Y. Nagasako-Akazome, D. Honma, M. Tagashira, T. Kanda, M. Yasue, and Y. Ohtake, “Safety evaluation of polyphenols extracted from hop bracts,” *Food and Chemical Toxicology*, vol. 45, no. 8, pp. 1383–1392, Aug. 2007, doi: 10.1016/j.fct.2007.01.019.
- [18] L. Bocquet, S. Sahpaz, J. L. Hilbert, C. Rambaud, and C. Rivière, “*Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology,” *Phytochemistry Reviews*, vol. 17, no. 5, pp. 1047–1090, Oct. 2018, doi: 10.1007/s11101-018-9584-y.
- [19] BRASIL, “Mercado cervejeiro cresce no brasil e aumenta interesse pela producao de lúpulo e cevada,” 2022.
- [20] BRASIL, *Lei Federal nº 10.711/2003*. 2003.
- [21] V. & T. A. Lopes A., “LÚPULO BRASILEIRO: QUESTÕES LEGAIS ESSENCIAIS,” *Advogado Cervejeiro*, 2021.
- [22] ANVISA, “RESOLUÇÃO - RDC Nº 42, DE 29 DE AGOSTO DE 2013,” 2013.
- [23] R. D. Espy, A. R. Muliadi, Z. Ouyang, and R. G. Cooks, “Spray mechanism in paper spray ionization,” *Int J Mass Spectrom*, vol. 325–327, pp. 167–171, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.ijms.2012.06.017.
- [24] J. Liu, H. Wang, N. E. Manicke, J. M. Lin, R. G. Cooks, and Z. Ouyang, “Development, characterization, and application of paper spray ionization,” *Anal Chem*, vol. 82, no. 6, pp. 2463–2471, Mar. 2010, doi: 10.1021/ac902854g.

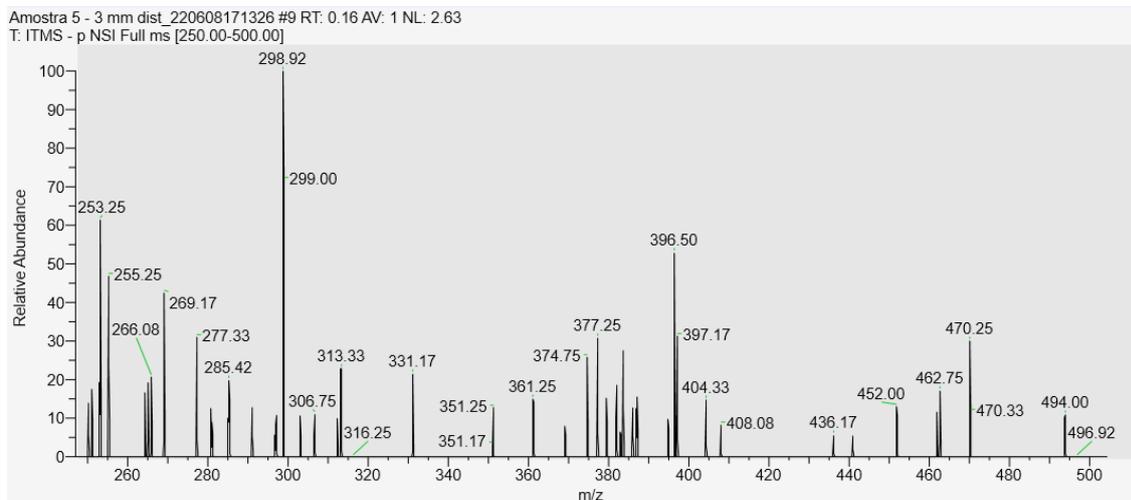
- [25] R. Z. Shi, E. T. M. el Gierari, N. E. Manicke, and J. D. Faix, "Rapid measurement of tacrolimus in whole blood by paper spray-tandem mass spectrometry (PS-MS/MS)," *Clinica Chimica Acta*, vol. 441, pp. 99–104, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.cca.2014.12.022.
- [26] R. M. Alberici *et al.*, "Ambient mass spectrometry: Bringing MS into the 'real world,'" *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 398, no. 1, pp. 265–294, Sep. 2010. doi: 10.1007/s00216-010-3808-3.
- [27] K. Blain, "Direct Analysis of Hops by Leaf Spray and Paper Spray Mass Spectrometry Spectrometry," 2012. [Online]. Available: https://scholarworks.wmich.edu/masters_theses/100
- [28] S. Chen *et al.*, "Temperature-responsive magnetite/PEO - PPO - PEO block copolymer nanoparticles for controlled drug targeting delivery," *Langmuir*, vol. 23, no. 25, pp. 12669–12676, Dec. 2007, doi: 10.1021/la702049d.
- [29] G. Negri, D. di Santi, and R. Tabach, "Bitter acids from hydroethanolic extracts of *Humulus lupulus* L., Cannabaceae, used as anxiolytic," *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 20, no. 6, pp. 850–859, 2010, doi: 10.1590/S0102-695X2010005000051.
- [30] I. Marova, K. Parilova, Z. Friedl, S. Obruca, and K. Duronova, "Analysis of phenolic compounds in lager beers of different origin: A contribution to potential determination of the authenticity of Czech beer," *Chromatographia*, vol. 73, no. SUPPL. 1, Jun. 2011, doi: 10.1007/s10337-011-1916-7.
- [31] C. A. Bizzi, E. L. M. Flores, J. A. Nóbrega, J. S. S. Oliveira, L. Schmidt, and S. R. Mortari, "Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H₂O₂ for the multielement determination of whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques," *J. Anal. At. Spectrom.*, vol. 29, no. 2, pp. 332–338, 2014, doi: 10.1039/C3JA50330E.
- [32] G. C. L. Araujo, M. H. Gonzalez, A. G. Ferreira, Ana, R. A. Nogueira, and J. A. Nobrega, "Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials," 2002.
- [33] C. A. Bizzi, J. S. Barin, E. I. Müller, L. Schmidt, J. A. Nóbrega, and E. M. M. Flores, "Evaluation of oxygen pressurized microwave-assisted digestion of botanical materials using diluted nitric acid," *Talanta*, vol. 83, no. 5, pp. 1324–1328, Feb. 2011, doi: 10.1016/j.talanta.2010.10.015.

- [34] J. E. Berry, Y. J. Lee, P. Thiel, and T. Holme, "Trace metal analysis by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry and x-ray K-edge densitometry of forensic samples," 2015.
- [35] C. A. Bizzi, J. S. Barin, J. S. S. Oliveira, C. Giancarlo, and E. M. M. Flores, "Microwave-assisted oxidation of organic matter using diluted HNO₃ under O₂ pressure: Rationalization of the temperature gradient effect for acid regeneration," *J Braz Chem Soc*, vol. 28, no. 9, pp. 1673–1681, Sep. 2017, doi: 10.21577/0103-5053.20170001.
- [36] R. Nageswara Rao and M. V. N. Kumar Talluri, "An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals," *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 43, no. 1, pp. 1–13, Jan. 04, 2007. doi: 10.1016/j.jpba.2006.07.004.
- [37] J. A. Carter, A. I. Barros, J. A. Nóbrega, and G. L. Donati, "Traditional calibration methods in atomic spectrometry and new calibration strategies for inductively coupled plasma mass spectrometry," *Frontiers in Chemistry*, vol. 6, no. NOV. Frontiers Media S.A., Nov. 01, 2018. doi: 10.3389/fchem.2018.00504.
- [38] F. C. Pinheiro, A. I. Barros, and J. A. Nóbrega, "Evaluation of dilute-and-shoot procedure for determination of inorganic impurities in liquid pharmaceutical samples by ICP OES," *Microchemical Journal*, vol. 146, pp. 948–956, May 2019, doi: 10.1016/j.microc.2019.02.021.
- [39] L. Fischer *et al.*, "Flow injection combined with ICP-MS for accurate high throughput analysis of elemental impurities in pharmaceutical products according to USP <232>/<233>," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 95, pp. 121–129, 2014, doi: 10.1016/j.jpba.2014.02.016.
- [40] A. Virgilio, J. A. Nóbrega, and G. L. Donati, "Multi-isotope calibration for inductively coupled plasma mass spectrometry," *Anal Bioanal Chem*, vol. 410, no. 3, pp. 1157–1162, Jan. 2018, doi: 10.1007/s00216-017-0753-4.
- [41] R. Thomas, *Practical guide to ICP-MS, Third ed.* M. Dekker, 2013.
- [42] R. G. Brereton, *Chemometrics : data analysis for the laboratory and chemical plant.* 2003.
- [43] H. N. T. Martens, *Multivariate calibration*, vol. 1. New York, 1989.
- [44] R. T. S. Frighetto and M. Luna-Guido, "Discrimination of management effects on soil parameters by using principal component analysis: a multivariate an... Related papers Influence of tillage, residue

- management , and crop rot at ion on soil microbial biomass and cat ...," 2002.
- [45] Inmetro, "ORIENTAÇÃO SOBRE VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS DOQ-CGCRE-008," 2020.
- [46] G. A. Helfer, F. Bock, L. Marder, J. C. Furtado, A. B. da Costa, and M. F. Ferrão, "Chemostat: Exploratory multivariate data analysis software," *Quim Nova*, vol. 38, no. 4, pp. 575–579, May 2015, doi: 10.5935/0100-4042.20150063.
- [47] Thermo Fisher Scientific, "FreeStyle." 2022.
- [48] L. Česlová, M. Holčapek, M. Fidler, J. Drštičková, and M. Lísa, "Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry," *J Chromatogr A*, vol. 1216, no. 43, pp. 7249–7257, Oct. 2009, doi: 10.1016/j.chroma.2009.09.022.
- [49] M. J. Simirgiotis, J. Benites, C. Areche, and B. Sepu, "Antioxidant capacities and analysis of phenolic compounds in three endemic nolana species by HPLC-PDA-ESI-MS," *Molecules*, vol. 20, no. 6, pp. 11490–11507, Jun. 2015, doi: 10.3390/molecules200611490.
- [50] M. Stavri, R. Schneider, G. O'Donnell, D. Lechner, F. Bucar, and S. Gibbons, "The antimycobacterial components of hops (*Humulus lupulus*) and their dereplication," *Phytotherapy Research*, vol. 18, no. 9, pp. 774–776, Sep. 2004, doi: 10.1002/ptr.1527.
- [51] Z. N. Demireva and P. F. Totova, "STUDIES ON THE FATTY ACID COMPOSITION OF HOP EXTRACT," *Journal of the Institute of Brewing*, vol. 101, no. 6, pp. 437–438, 1995, doi: 10.1002/j.2050-0416.1995.tb00880.x.
- [52] M. Kraemer, S. Broecker, T. Kueting, B. Madea, and A. Maas, "Fatty acid esters as novel metabolites of γ -hydroxybutyric acid: A preliminary investigation," *Drug Test Anal*, vol. 14, no. 4, pp. 690–700, Apr. 2022, doi: 10.1002/dta.3213.
- [53] C. A. Hughey, C. M. McMinn, and J. Phung, "Beeromics: from quality control to identification of differentially expressed compounds in beer," *Metabolomics*, vol. 12, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2016, doi: 10.1007/s11306-015-0885-5.
- [54] M. Dresel, C. Vogt, A. Dunkel, and T. Hofmann, "The Bitter Chemodiversity of Hops (*Humulus lupulus* L.)," *J Agric Food Chem*, vol. 64, no. 41, pp. 7789–7799, Oct. 2016, doi: 10.1021/acs.jafc.6b03933.

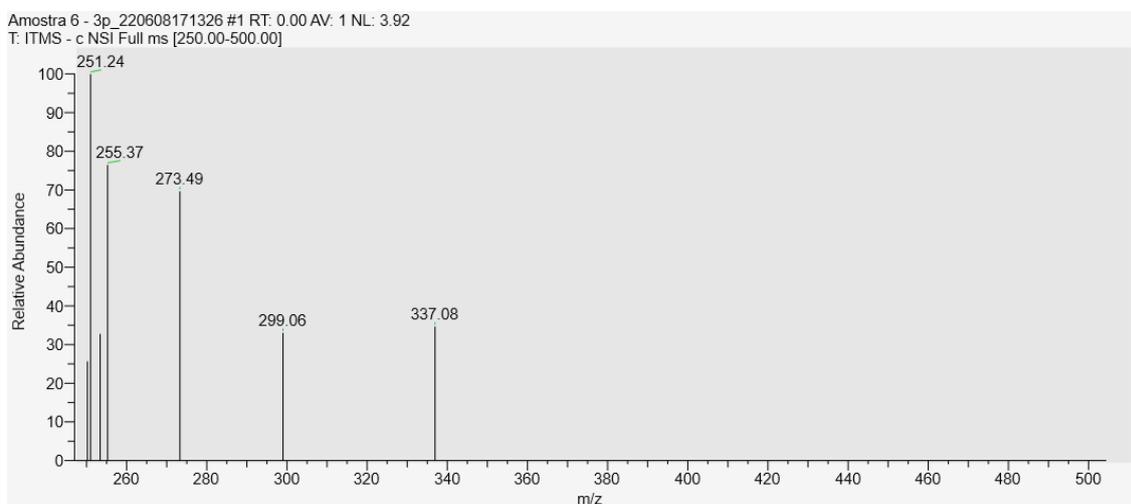
- [55] K. P. Cheiran, "Determinação do perfil de compostos fenólicos e nitrogenados de cervejas artesanais por HPLC-DAD-ESI-MS/MS," Porto Alegre, 2018.
- [56] P. Q. Rada, "Risk and benefits of beer and nonalcoholic beer moderate consumption on cardiovascular system," 2017. [Online]. Available: www.tdx.cat
- [57] V. Jerkovic and S. Collin, "Fate of resveratrol and piceid through different hop processings and storage times," *J Agric Food Chem*, vol. 56, no. 2, pp. 584–590, Jan. 2008, doi: 10.1021/jf072465f.
- [58] National Center for Biotechnology Information, "PubChem Compound Summary for CID 131751470, Viniferifuran.," 2022.
- [59] J. F. Stevens *et al.*, "Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol," 2000. [Online]. Available: www.elsevier.com/locate/phytochem
- [60] X. Zhang, X. Liang, H. Xiao, and Q. Xu, "Direct characterization of bitter acids in a crude hop extract by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry," *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 15, no. 2, pp. 180–187, 2004, doi: 10.1016/j.jasms.2003.09.014.
- [61] J. Tang, F. R. Dunshea, and H. A. R. Suleria, "LC-ESI-QTOF/MS characterization of phenolic compounds from medicinal plants (Hops and Juniper Berries) and their antioxidant activity," *Foods*, vol. 9, no. 1, 2020, doi: 10.3390/foods9010007.
- [62] A. Maietti *et al.*, "Metabolite profiling of flavonols and in vitro antioxidant activity of young shoots of wild *Humulus lupulus* L. (hop)," *J Pharm Biomed Anal*, vol. 142, pp. 28–34, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.jpba.2017.04.043.

Anexos



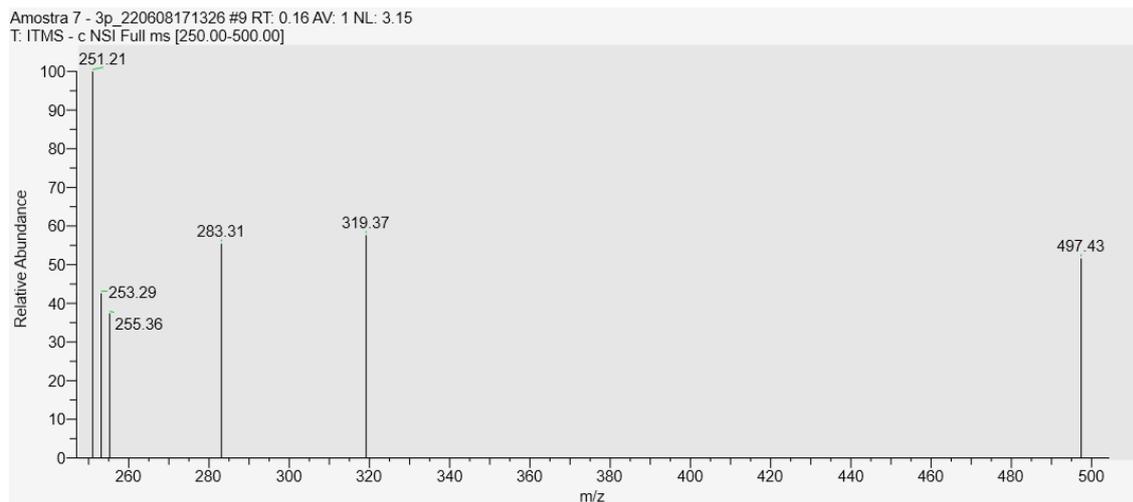
Fonte: Dados do próprio autor. Obtido do FreeStyle [47] (Thermo Fisher Scientific)

Figura S1 - Espectro de massas da análise realizada com a solução 1 na otimização da técnica (metanol e água ultrapura 1:1 v v⁻¹).



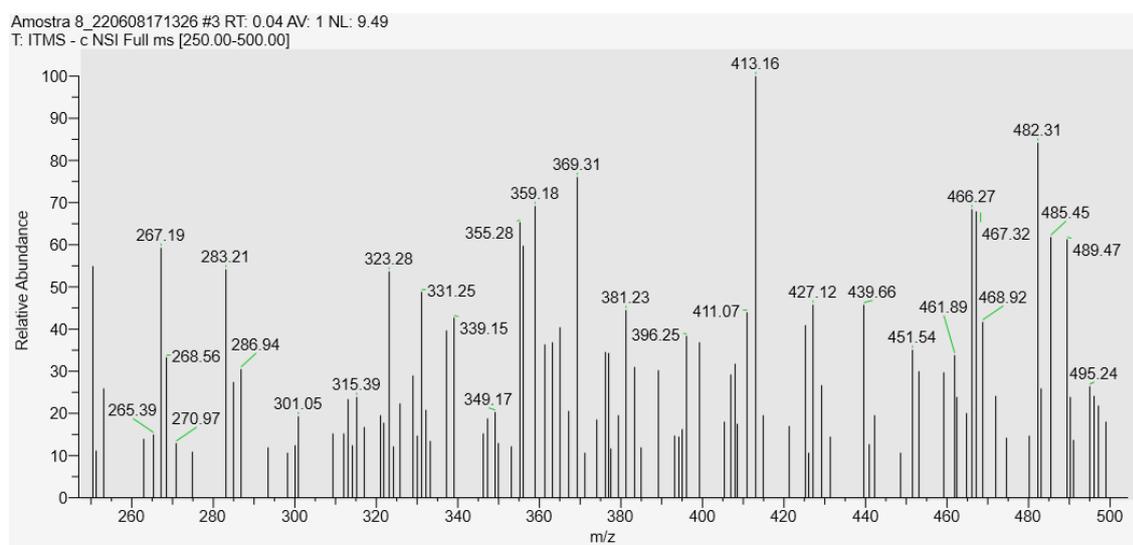
Fonte: Dados do próprio autor. Obtido do FreeStyle [47] (Thermo Fisher Scientific)

Figura S2 - Espectro de massas da análise realizada com a solução 2 na otimização da técnica (metanol 100% v v⁻¹).



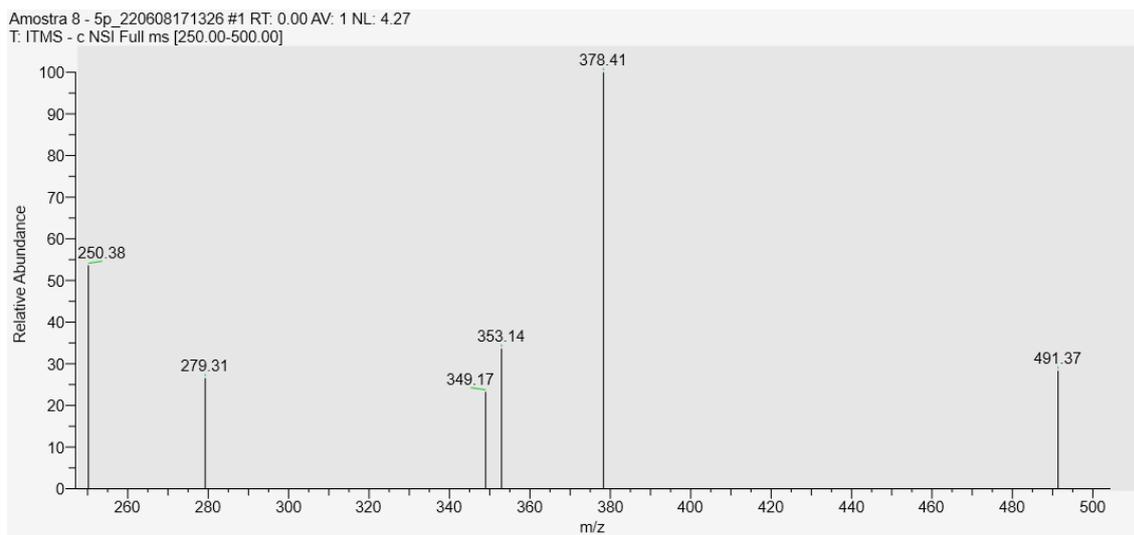
Fonte: Dados do próprio autor. Obtido do FreeStyle [47] (Thermo Fisher Scientific)

Figura S3 - Espectro de massas da análise realizada com a solução 3 na otimização da técnica (ácido fórmico 1% v v⁻¹ e metanol 1:1 v v⁻¹).



Fonte: Dados do próprio autor. Obtido do FreeStyle [47] (Thermo Fisher Scientific)

Figura S4 - Espectro de massas da análise realizada com a solução 4 na otimização da técnica com uma distância de 3 mm do papel ao equipamento. (ácido fórmico 1% v v⁻¹).



Fonte: Dados do próprio autor. Obtido do FreeStyle [47] (Thermo Fisher Scientific)

Figura S5 - Espectro de massas da análise realizada com a solução 4 na otimização da técnica com uma distância de 5 mm do papel ao equipamento.

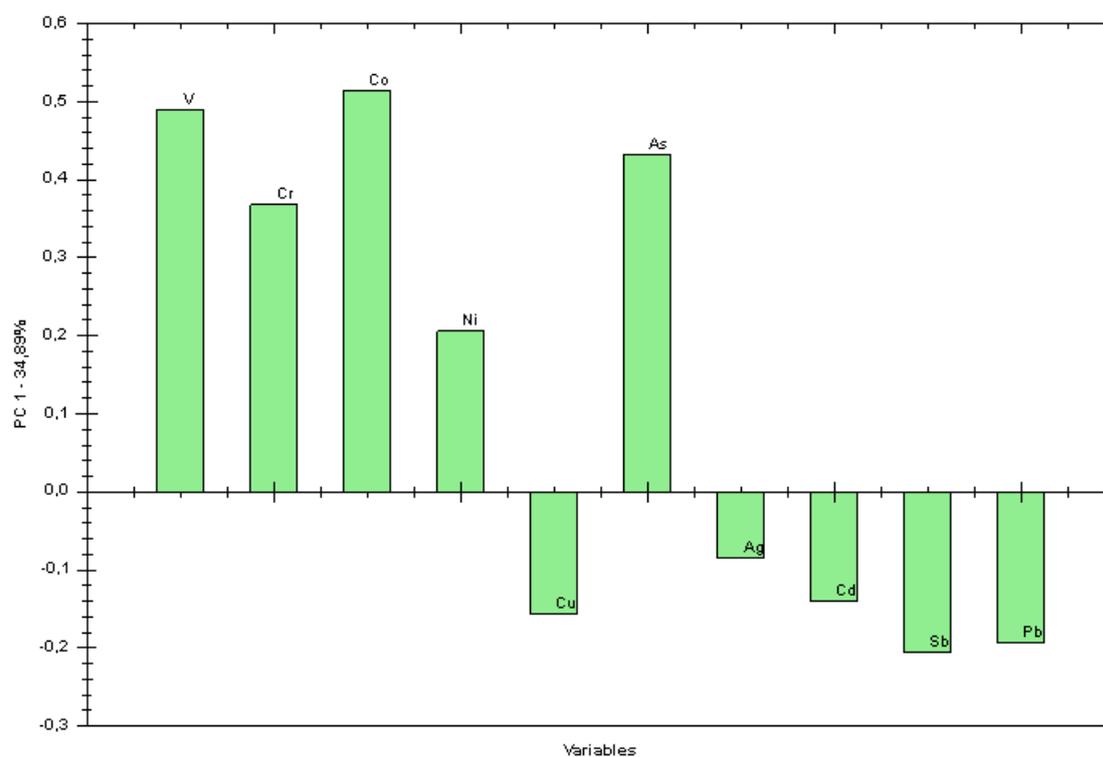


Figura S6 – Gráfico de loadings da PC1 obtida na PCA dos analitos inorgânicos determinados por ICP-MS.

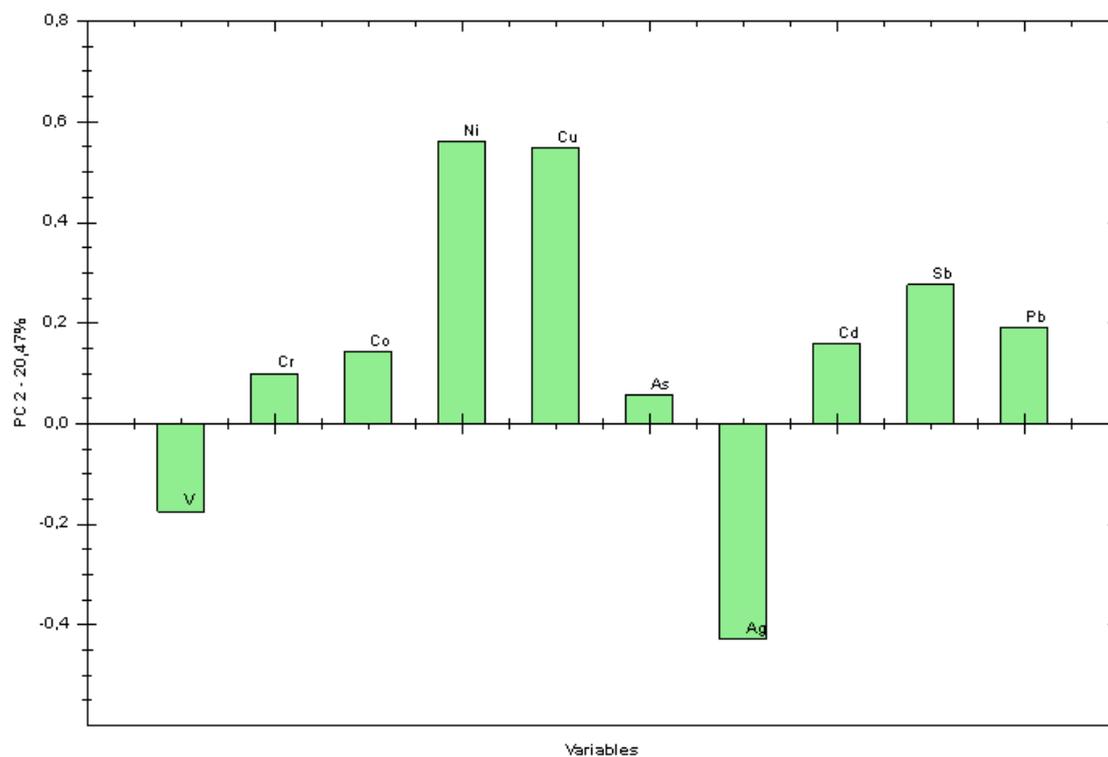


Figura S7 - Gráfico de loadings da PC2 obtida na PCA dos analitos inorgânicos determinados por ICP-MS.