

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Lucas Mattos Duarte

Desenvolvimento de métodos analíticos por técnicas de eletromigração, cromatográficas e espectroscópicas para detecção e determinação de α e β -ácidos, terpenos e ácidos graxos em amostras comerciais de Lúpulo (*Humulus lupulus L.*)

Juiz de Fora

2018

Lucas Mattos Duarte

Desenvolvimento de métodos analíticos por técnicas de eletromigração, cromatográficas e espectroscópicas para detecção e determinação de α e β -ácidos, terpenos e ácidos graxos em amostras comerciais de Lúpulo (*Humulus lupulus L.*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora

2018

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Duarte, Lucas Mattos.

Desenvolvimento de métodos analíticos por técnicas de eletromigração, cromatográficas e espectroscópicas para detecção e determinação de α e β -ácidos, terpenos e ácidos graxos em amostras comerciais de Lúpulo (*Humulus lupulus* L.) / Lucas Mattos Duarte. -- 2018.

163 p. : il.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.

1. Lúpulo. 2. α e β -ácidos. 3. Terpenos. 4. Ácidos Graxos. 5. Eletroforese Capilar. I. Oliveira, Marcone Augusto Leal de, orient. II. Título.

Agradecimentos

A Deus, que por sua infinita graça tem me proporcionado muito mais do que mereço, por ter me sustentado nos momentos difíceis e por sempre estar atento às minhas orações. Agradeço a Deus por ter aberto meus olhos para a vida que vale a pena ser vivida.

Agradeço à minha família, meu local de conforto, renovação de forças e motivo de inspiração a fim de continuar a caminhada e galgar postos sempre maiores. Em especial a minha mãe (Sônia) que sempre sonhou com um futuro de dedicação aos estudos e que com muito esforço conseguiu me convencer que era o melhor caminho. Eu devo tudo a você mãe e atribuo grande parte dessa conquista a sua pessoa. Ao meu pai (Romeu), que sempre cuidou de nós com maestria e muito amor. Observar seu caráter, sua moral e sua dedicação à família tem sido os maiores exemplos para forjar a minha personalidade. À minha amada irmã Bibi (Gabriela), que com seu jeito peculiar e inspirador me motivam a avançar na caminhada e chegar sempre mais longe.

Em especial e com muito amor à minha esposa (Giovanna), que passou a fazer parte de minha vida no curso do doutoramento e se tornou minha melhor companhia. Obrigado por toda dedicação ao nosso casamento, por ser essa maravilhosa amiga e esposa, por compreender os momentos difíceis de dedicação aos estudos e por me motivar a continuar. Te amo eternamente!

À nova família que Deus me apresentou (Márcio, Gil e Luma), me proporcionando ser filho, irmão e amigo pela segunda vez. Obrigado por todas conversas, conselhos, risadas e por toda dedicação sem medidas à minha pessoa. Vocês são fantásticos!

Ao meu querido, amigo, padrinho e orientador Prof. Dr. Marcone A. L. de Oliveira pela amizade, parceria e pelas inúmeras discussões (científicas ou não) que me trouxeram enorme crescimento profissional e pessoal. Sua generosidade, paciência e diligência me inspiram. Obrigado por todas oportunidades e puxões de orelha!

A todos os amigos que fiz no GQAQ ao longo dos últimos seis anos. Seria impossível realizar tudo que fiz e aprender tudo que aprendi se não fosse pela contribuição de todos os GQAQuianos. Em especial, agradeço ao Luiz Henrique que vem me ajudando nos trabalhos experimentais e discussões científicas, bem como a

Tatiane Amorim por toda ajuda e parceria, especialmente no último ano, o que tem resultado em vários trabalhos.

Agradeço a todos os amigos que fiz na UFJF ao longo desses aproximadamente 10 anos de graduação, mestrado e doutorado, incluindo colegas de turma, técnicos e professores. Em especial agradeço a amiga e madrinha Leandra, que sempre esteve ao meu lado. Também agradeço o técnico Fernando pela amizade e dedicação.

Agradeço ao Prof. Dr. Alexandre Amaral Leitão pela primeira oportunidade na vida científica, quando eu ainda era aluno de graduação e me encontrava desmotivado com a área acadêmica. Em especial ao Dr. Ary Rodrigues Ferreira Júnior, que muito me inspirou no início da caminhada, me ensinando sobre a seriedade e o rigor científico que se deve adotar nos trabalhos.

Agradeço ao empresário Bruno Muller, que sempre me forneceu por doação as muitas amostras de lúpulo para realização desse trabalho. Se não fosse sua contribuição seria impossível realizar esse projeto. Agradeço também por ter confiado a mim e ao Prof. Marcone a oportunidade de contribuir para seu TCC.

Agradeço ao Prof. Dr. Keyller Borges (UFSJ) por abrir as portas de seu laboratório e permitir que eu tivesse acesso irrestrito às suas dependências para utilização do equipamento de eletroforese capilar enquanto o nosso se encontrava fora de operação. O trabalho publicado que endossa a defesa dessa tese foi executado durante uma semana de missão em seu laboratório.

Agradeço ao Prof. Dr. Richard M. Grazul por todos ensinamentos envolvendo preparos de amostra e GC-MS, pela oportunidade de envolvimento em vários trabalhos e pelas conversas científicas, principalmente pela maioria delas ser em inglês.

Agradeço a todos os pesquisadores envolvidos nos trabalhos de colaboração em que tive a oportunidade de participar até o presente momento.

“O coração do homem considera o seu caminho, mas o SENHOR lhe dirige os passos”

(Bíblia Sagrada, Pv 16:9)

RESUMO

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma planta complexa em sua composição química, tendo sua principal aplicação na indústria cervejeira. Nesse trabalho, foram desenvolvidas metodologias para o estudo dos principais metabólitos que desempenham importantes papéis no processo de produção de cervejas. Os α -ácidos são precursores do amargor característico da cerveja, enquanto que os β -ácidos apresentam ação bacteriostática. Primeiramente, foi otimizada uma metodologia considerando a etapa de extração e análise por eletroforese capilar de zona com detecção no ultravioleta, onde foi possível separar e identificar quatro α e β -ácidos. À partir do perfil eletroforético de diferentes variedades de lúpulo, foi possível classificar lúpulos aromáticos e de amargor sem a utilização de padrões analíticos, empregando análise de componentes principais. Em uma segunda etapa, foi otimizado um método por cromatografia eletrocínica micelar modificada com ciclodextrina e detecção no ultravioleta, empregando abordagens uni e multivariada, para a separação completa dos isômeros e homólogos de α e β -ácidos, apresentando tempo de separação de 7,8 minutos. O segundo metabólito estudado foi a classe dos terpenos. O óleo essencial do lúpulo é composto majoritariamente por esses compostos, os quais são responsáveis pela aromatização das cervejas. Eles foram identificados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, sendo empregado um simples método de preparo de amostras por extração direta com solvente assistida por ultrassom. Dezoito terpenos, entre mono e sesquiterpenos, foram identificados. Os diferentes teores desses terpenos foram utilizados para modelagem quimiométrica por análise de componentes principais e de *clusters*, o que permitiu a classificação de diferentes variedades de lúpulos, podendo diferenciá-los em lúpulos de aroma, amargor ou de duplo propósito. Por fim, os ácidos graxos foram estudados no lúpulo. Esses compostos tem seu estudo mais negligenciado em lúpulos quando comparado com os metabólitos descritos anteriormente. Eles desempenham importantes papéis no processo de produção, como na etapa de fermentação, no entanto, eles podem contribuir para geração de sabores indesejáveis na cerveja. Diferentes metodologias analíticas foram desenvolvidas para determinação dos ácidos graxos em lúpulos. Quatorze ésteres de ácidos graxos foram determinados em trinta amostras de lúpulo por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama após a otimização das etapas de extração lipídica, empregando o método de Folch e Stanley e da reação de transesterificação via catálise básica. Para esses mesmos

lúpulos foi proposto a construção de modelos de calibração multivariada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear para o núcleo de hidrogênio associada a regressão por mínimos quadrados parciais com e sem seleção de variáveis para a determinação dos ácidos graxos C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:1, C20:2 e C22:2. Os resultados evidenciaram a complexidade da matriz, no entanto a abordagem é vista como promissora. Adicionalmente, foi proposta uma abordagem para determinação dos ácidos graxos C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 em lúpulos por eletroforese capilar de zona com detecção indireta no ultravioleta. O preparo de amostras foi otimizado pela reação de saponificação direta das amostras e o método foi adequadamente validado levando em consideração os principais parâmetros de validação, tais como: linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e quantificação e seletividade.

Palavras-chave: Lúpulo. α e β -ácidos. Terpenos. Ácidos Graxos. Eletroforese Capilar. Cromatografia Gasosa. Quimiometria.

ABSTRACT

Hop (*Humulus lupulus L.*) is a plant with a complex chemistry composition and the main hop application relies on brewing industry. In this work methodologies were developed to study the main hop metabolites that plays important roles in brewing process. The α -acids are precursors of the characteristic beer bitterness, the β -acids have bacteriostatic effects. Firstly, a methodology was optimized considering the extraction step followed by capillary zone electrophoresis analysis with ultraviolet detection, which enabled the separation and identification of four α and β -acids. From the electrophoretic profile of the different hop varieties, it was possible to classify aromatic and bitter hops without the use of analytical standards by employing principal component analysis. As a second step, it was optimized a method by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography with ultraviolet detection, considering uni and multivariate approaches, to completely separate isomers and homologues of α and β -acids compounds, which occurred in a separation time of 7.8 minutes. The second metabolite studied was the terpene class. The hop essential oil is essentially formed by these compounds, which are responsible for beer aroma. They were identified by gas chromatography coupled to mass spectrometry, being employed a simple sample preparation by using a direct solvent extraction assisted by ultrasound. Eighteen terpenes, considering mono and sesquiterpenes, were identified. The different contents of thirteen terpenes were used to perform the chemometric modeling by principal component analysis and cluster analysis, which enabled the classification of different hop varieties, making possible differentiate aroma, bitter and dual purpose hops. Finally, fatty acids in hops were studied. These compounds are neglected in hops when compared to the aforementioned metabolites. They play important roles in brewing, as in fermentation step, however they may contributes to off flavors in beer. Different analytical methodologies were developed to determine fatty acids in hops. Fourteen fatty acids methyl esters were determined in thirty hop samples by gas chromatography with flame ionization detector after the lipid extraction carried out employing Folch and Stanley procedure and a base-catalyzed transesterification reaction. To the same hop sample, it was proposed the building of multivariate calibration models by proton nuclear magnetic resonance in association with partial least squares regression, with and without variable selection, to determine the fatty acids C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:1, C20:2 and C22:2. The results showed the matrix complexity, however, the

approach is regarded as promising. Additionally, it was proposed an approach to determine the fatty acids C16:0, C18:0, C18:1 and C18:2 in hops by capillary zone electrophoresis with indirect ultraviolet detection. The sample preparation was optimized considering a direct sample saponification reaction and the method was properly validated taking into account the main validation parameters, such as: linearity, precision, accuracy, limits of detection and quantification and selectivity.

Keywords: Hop. α and β -acids. Terpenes. Fatty Acids. Capillary Electrophoresis. Gas Chromatography. Chemometrics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas moleculares dos α e β -ácidos.....	34
Figura 2: Eletroferogramas do extrato hidrometanólico (MeOH/H ₂ O 80:20 v/v) para avaliar as modificações de voltagem e pressão de injeção no modo hidrodinâmico conforme descrito na Tabela 3. A correlação entre a Figura 2 e a Tabela 3 é dada por: teste 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4(D) e 6(E). O teste 5 refere-se ao mesmo gráfico B pois foi realizado com +20 kV de voltagem e pressão de injeção 25 mbar/5 s. O eletrólito foi composto de carbonato de amônio a 160 mmol L ⁻¹ em pH 9 e os analitos foram monitorados em 230 nm.....	42
Figura 3: Eletroferogramas das extrações descritas na Tabela 4. A correlação entre a Figura 3 e a Tabela 4 é: gráfico A (Ext1), B (Ext2), C(Ext3), D(Ext4), E(Ext5) e E(Ext6). Método eletroforético: BGE – 160 mmol L ⁻¹ de carbonato de amônio (pH 9); voltagem de +20 kV; injeção: modo hidrodinâmico 25 mbar/5 s; temperatura do cartucho de 25 °C; capilar de 62,5 cm de comprimento total (54 cm de comprimento efetivo – 50 μ m i.d.), detecção em 230 nm (2,5 Hz)	44
Figura 4: Esquema do método de extração adotado no trabalho	45
Figura 5: Eletroferograma com ampliação na região de interesse e esquema de separação no modo CZE em contra-fluxo para α e β -ácidos usando os métodos de extração e eletroforéticos otimizados. Condições eletroforéticas: Mesma descritas na Figura 4	46
Figura 6: Eletroferogramas das 32 amostras sem alinhamento (A) e após alinhamento utilizando a ferramenta icoshift (B). Para ambos os gráficos uma expansão na região entre 14 e 18 minutos evidencia o desalinhamento e alinhamento dos picos, respectivamente	48
Figura 7: Gráfico de loadings da PCA realizada com todo eletroferograma alinhado conforme resultado disponível na Figura 9 A	49
Figura 8: Efeito do pré-processamento nos 32 eletroferogramas das amostras de lúpulo quando aplicado: autoescalamento (B), centragem na média (C), filtro derivativo SG (D), escalonamento por pareto (E) e transformação SNV (F). O gráfico A mostra os eletroferogramas apenas alinhados.	50

Figura 9: Análise de componentes principais dos eletroferogramas de dezesseis tipos de extratos hidrometanólicos de lúpulo em duplicata usando toda informação eletroforética (A, B e C), a região dos picos de α e β -ácidos (D, E e F) e somente a região dos picos dos α -ácidos (G, H e I). Também foram levados em consideração a PCA com dados sem pré-processamento (A, D e G), autoescalando (B, E e H) e centrando na média (C, F e I).....	52
Figura 10: Análise de componentes principais dos eletroferogramas de dezesseis tipos de extratos hidrometanólicos de lúpulo em duplicata usando toda informação eletroforética (A, B e C), a região dos picos de α e β -ácidos (D, E e F) e somente a região dos picos dos α -ácidos (G, H e I). Também foram levados em consideração a PCA com dados aplicando filtro derivativo SG (A, D e G), aplicando pareto (B, E e H) e aplicando SNV (C, F e I)	53
Figura 11: Análise de componentes principais dos eletroferogramas alinhados e centrados na média de dezesseis tipos de extratos hidrometanólicos de lúpulo em duplicata usando a região dos picos dos α -ácidos	56
Figura 12: Efeito dos constituintes do BGE na separação de α e β -ácidos em extratos de lúpulo por MEKC. Efeito do TB (A e B): de 30,0 para 50,0 mmol L ⁻¹ ; SDS (C e D): de 36,0 para 54,0 mmol L ⁻¹ ; ACN (E e F): de 0 para 20% v/v. BGE otimizado por MEKC (G): 40,0 mmol L ⁻¹ de TB, 45,0 mmol L ⁻¹ de SDS e 10% v/v de ACN. Parâmetros constantes: temperatura do cartucho (25 °C), voltagem (20 kV), injeção (25 mbar/5 s) e capilar (48,5 cm de comprimento total, 40,0 cm de efetivo; 50 μ m i.d. e 375 μ m o.d.).	64
Figura 13: (A) Inclusão de 20,0 mmol L ⁻¹ de β -CD no BGE criando o modo CD-MEKC-UV; (B) Efeito do TB quando 30,0 mmol L ⁻¹ é usado no BGE em comparação com 40 mmol L ⁻¹ do eletroferograma A. Os espectros eletrônicos na região do UV são mostrados para todos analitos.....	66
Figura 14: (A) Eletroferograma de um extrato lipídico por CD-MEKC; (B) ordem de migração dos analitos; (C) esquema do mecanismo de separação para CD-MEKC-UV68	
Figura 15: Superfície de respostas para avaliação de temperatura e voltagem na otimização de parâmetros instrumentais de CE.....	70
Figura 16: Eletroferogramas do planejamento experimental Box-Behnken 3 ³ para otimização dos parâmetros instrumentais. Condições fixas: BGE composto de 30 mmol	

L ⁻¹ de TB, 45 mmol L ⁻¹ de SDS, 20 mmol L ⁻¹ de β-CD e 10% v/v de ACN; 25 mbar; comprimento total do capilar de 48, cm (40 cm efetivo), 50 μm i.d. e 375 μm o.d.....	72
Figura 17: Eletroferograma de vinte e uma amostras de lúpulo injetados em duplicata. Condições eletroforéticas: BGE composto de 30,0 mmol L ⁻¹ de TB, 45,0 mmol L ⁻¹ de SDS, 20,0 mmol L ⁻¹ de β-CD e 10% v/v de ACN; temperatura do cartucho de 25 °C; voltagem positiva de 23 kV; injeção hidrodinâmica de 25 mbar/7,0 s; comprimento total do capilar de 48,5 cm (40,0 cm efetivo), 50 μm i.d. e 375 μm o.d.....	81
Figura 18: Cromatogramas obtidos por GC-MS para um óleo essencial (A), para um extrato em HEX (B) e para um extrato em DCM (C). Identificação dos compostos – 1: β-Mirceno; 2: Limoneno; 3: Linalol; 4: Geraniol; 5: α-Copaeno; 6: β-Cariofileno; 7: β-Cubebeno; 8: α-Bergamoteno; 9: α-Humuleno; 10: γ-Muroleno; 11: β-Selineno; 12: α-Selineno; 13: α-Muuroleno; 14: α-Farneseno; 15: γ-Cadineno; 16: δ-Cadineno; 17: Eremofileno; 18: Eudesma-3,7(11)-dieno.....	89
Figura 19: Loadings da PCA considerando as três principais PCs.....	97
Figura 20: Gráfico biplot de scores para tentativa de reconhecimento de padrões das amostras de lúpulo a partir de seu perfil aromático.	98
Figura 21: Dendrograma para análise hierárquica de cluster para auxílio na interpretação do gráfico biplot de scores da Figura 20.	99
Figura 22: Concentrações de β-mirceno, β-cariofileno e α-humuleno, bem como as razões α-humuleno/β-mirceno e α-humuleno/β-cariofileno, para todas as amostras analisadas. Amostras destacadas em vermelho nas Figura 20 e 21 foram agrupadas no gráfico de barras (A); amostras destacadas em verde localizados nos scores positivos da PC2 (Figura 20) foram agrupadas no gráfico (B). As demais amostras, também destacadas em verde e localizadas nos scores negativos da PC2, tem sua correlação quantitativa mostrada no gráfico C.	100
Figura 23: Cromatogramas por GC-FID da RTCA (A) e da RTCB (B) da fração lipídica do lúpulo. Condições do GC: coluna capilar CP-SIL 88 para FAME (100 m, 0,25 mm x 0,2 μm); volume de injeção de 1,0 μL; razão do split de 1:30; temperaturas do detector e da injetora fixadas em 240 °C; programação do forno: inicia a 100 °C e é mantida por 5 min, seguido de aumento até 240 °C a uma taxa de 4 °C min ⁻¹ e então mantido por 20 min	111

Figura 24: Perfil cromatográfico de FAMES de trinta amostras de lúpulo, considerando vinte e quatro diferentes variedades, por GC-FID, quando empregados os métodos de Folch e Stanley para extração lipídica e a RTCB para transesterificação. Condições do GC: as mesmas descritas na Figura 23.	116
Figura 25: Espectros de ¹ H NMR (500 MHz) para uma amostra de extrato lipídico de lúpulo (LUP) e para os AG C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2, bem como as atribuições dos principais sinais dos AG.	128
Figura 26: Efeito visual do alinhamento pela utilização da ferramenta icoshift	129
Figura 27: Avaliação dos pré-processamentos nos espectros quando: somente alinhados (A); alinhados e aplicando o filtro derivativo Savitzki-Golay (B); alinhados e aplicando a transformação SNV (C); alinhados e aplicando a correção de linha base airPLS (D)	130
Figura 28: Principais parâmetros para os modelo testados para determinação de C16:0 no lúpulo por ¹ H NMR: R ² _{cv} e R ² _p (A); RMSECV e RMSEP (B); informações de pré-processamento, tipo de modelagem, definição dos intervalos e LVs	133
Figura 29: Estruturas moleculares para C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2	138
Figura 30: Comparação entre os perfis eletroforéticos de AG no lúpulo para os métodos de extração por Hara e Radin (A), Folch e Stanley (B), Bligh e Dyer (C) seguidos de saponificação e para a saponificação direta (D). Os principais parâmetros para o método por CZE foram: BGE composto de 15 mmol L ⁻¹ de tampão NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ (pH 6,86), 4 mmol L ⁻¹ de SDBS, 8,3 mmol L ⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v n-octanol; temperatura do cartucho de 25 °C; voltagem positiva de 19 kV; injeção hidrodinâmica de 12 mbar/4,0 s; capilar de TSP (48,5 cm e 40,0 cm de comprimento total e efetivo respectivamente – 75 µm i.d e 375 µm o.d.); detecção em 224 nm (± 2,0 nm taxa de aquisição de 2,5 Hz)	143
Figura 31: Confirmação dos AG C18:0 (A), C18:1 (B), C16:0 (C) e C18:2 (D) em uma amostra de lúpulo pela fortificação com padrões analíticos destacados em negrito. Condições eletroforéticas: as mesmas apresentadas na Figura 30. N.I. se referem aos AG não identificados	145

Figura 32: Teste de seletividade pela injeção de BGE, MeOH, mistura de C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2 ($0,7 \text{ mmol L}^{-1}$) e uma amostra de lúpulo saponificada. As condições eletroforéticas são as mesmas descritas na Figura 30.151

Figura 33: Perfil eletroforético dos AG de cinco diferentes variedades de lúpulos: (A) Amarillo; (B) Chinook; (C) Columbus; (D) Er Golding (E) e (F) Mosaic. As condições eletroforéticas foram as mesmas descritas na Figura 30.152

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Componentes majoritários presentes no lúpulo	23
Tabela 2: Amostras de lúpulo em pellet com suas respectivas pesagens em duplicata e seus % α -A	38
Tabela 3: Testes univariados para otimização dos parâmetros de CZE-UV para identificação dos α -ácidos	39
Tabela 4: Métodos de extração testados para identificação dos α -ácidos em amostras de lúpulo por CZE-UV	40
Tabela 5: Variância explicada para todas as PCAs considerando os pré-processamentos avaliados.	51
Tabela 6: Lúpulos comerciais submetidos ao procedimento de extração e posteriormente analisadas por CD-MEKC-UV.	61
Tabela 7: Fatores estudados e seus níveis para o design experimental Box-Behnken 3^3	62
Tabela 8: Matriz do planejamento Box-Behnken 3^3 codificada. Voltagem, tempo de injeção e temperatura do cartucho foram usados como fatores em três níveis.	69
Tabela 9: Coeficientes de regressão e avaliação dos efeitos através de cálculos através do intervalo de significância	71
Tabela 10: Comparação entre o método proposto e literatura para separação de α e β -ácidos considerando as técnicas de CE e LC.	75
Tabela 11: Testes de precisão intradia e interdia para avaliação da precisão do método considerando áreas e tempo de migração para todos os seis α e β -ácidos	82
Tabela 12: Comparação dos métodos de extração por hidrodestilação, extração com HEX e extração com DCM para obtenção da composição dos terpenos no lúpulo.	92
Tabela 13: Composição terpênica de lúpulos de diferentes variedades por GC-MS	95
Tabela 14: Diferença na composição dos AG do lúpulo quando empregados RTCA e RTCB e analisado por GC-FID	112
Tabela 15: Composição dos AG (em g/100 g de planta) de trinta amostras de lúpulo considerando cálculos por normalização de área	118

Tabela 16: Diferentes variedades de lúpulos utilizadas com suas respectivas massas e as massas de extrato lipídico obtidas após o preparo de amostra.	123
Tabela 17: Variância explicada para as três principais PCs considerando os testes de pré-processamento	131
Tabela 18: Principais parâmetros de modelagem obtidos por siPLS para C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:1, C20:2 e C22:2	136
Tabela 19: Resultados compilados para o teste de linearidade e LD e LQ	147
Tabela 20: Avaliação da precisão do método considerando injeções de réplicas intradia e interdía para razão de tempo de migração e área para todos analitos.	148
Tabela 21: Exatidão obtida por adição e recuperação em três níveis sucessivos de concentração para C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2	150
Tabela 22: Quantificação em duplicata de C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2 em cinco diferentes variedade de lúpulo (Amarillo, Chinook, Columbus, Er Golding e Mosaic) por CZE-DAD	153

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN – Acetonitrila

AG – Ácido Graxo

BGE – Eletrólito (do inglês, background electrolyte)

CARS – Competitive Adaptative Reweighted Sampling (do inglês)

CD – Ciclodextrina

CD-MEKC – Cromatografia Eletrocínética Micelar modificada com Ciclodextrina (do inglês, Cyclodextrin-modified Micellar Electrokinetic Chromatography)

CE – Eletroforese Capilar (do inglês, Capillary Electrophoresis)

CMC – Concentração Micelar Crítica

COW – Correlation Optimised Warping (do inglês)

CZE – Eletroforese Capilar de Zona (do inglês, Capillary Zone Electrophoresis)

DAD – Detector com Arranjo de Diodos (do inglês, Diode Array Detector)

DCM – Diclorometano

EOF – Fluxo Eletrosmótico (do inglês, Electroosmotic Flow)

FAME – Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (do inglês, Fatty Acid Methyl Ester)

FE – Fase Estacionária

FM – Fase Móvel

FMO – Fórmula Molecular

FT – Transformada de Fourier (do inglês, Fourier Transform)

GA – Algoritmos Genéticos (do inglês, Genetic Algorithms)

GC – Cromatografia Gasosa (do inglês, Gas Chromatography)

GC-FID – Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (do inglês, Gas Chromatography with Flame Ionization Detector)

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massas (do inglês, Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry)

^1H NMR – Ressonância Magnética Nuclear para o núcleo de Hidrogênio (do inglês, proton nuclear magnetic resonance)

HEX – Hexano

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês, High Performance Liquid Chromatography)

HS-SPME – Microextração em fase Sólida por Headspace (do inglês, Headspace Solid Phase Microextraction)

icoshift – interval-correlation-shifting (do inglês)

i.d. – Diâmetro interno do capilar (do inglês, Inner Diameter)

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

LVs – Variáveis Latentes (do inglês, Latent Variables)

MeOH – Metanol

MIR – Infravermelho Médio (do inglês, Mid Infrared)

NIR – Infravermelho Próximo (do inglês, Near Infrared)

N.I. – Picos Não Identificados

o.d. – Diâmetro Externo do Capilar (do inglês, Outer Diameter)

PC – Componente Principal (do inglês, Principal Component)

PCA – Análise por Componentes Principais (do inglês, Principal Component Analysis)

PI – Padrão Interno

PLS – Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (do inglês, Partial Least Squares Regression)

iPLS – PLS por intervalos

siPLS – PLS por sinergismo de intervalos

rf – Radiofrequência

RMSECV – Raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (do inglês, Root Mean Squares Error of Cross-Validation)

RMSEP – Raiz quadrada do erro quadrático médio de previsão (do inglês, Root Mean Squares Error of Prediction)

RTCA – Reação de Transesterificação via Catálise Ácida

RTCB – Reação de Transesterificação via Catálise Básica

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio (do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate)

SDBS – Dodecilbenzenosulfonato de sódio (do inglês, sodium dodecylbenzenesulfonate)

SNV – Transformação Normal Padrão de Variação (do inglês, Standard Normal Variate transform)

SG – Filtro derivativo Savitzky-Golay

TB – Tetraborato de Sódio

LISTA DE SÍMBOLOS

Brij 35 – Polyoxietileno 23 lauril éter

R^2_p – Coeficiente de determinação para previsão

R^2_{cv} – Coeficiente de determinação para validação cruzada

μ_{ef} – Mobilidade Efetiva

μ_{ep} – Mobilidade Eletroforética

μ_{eo} – Mobilidade Eletrosmótica

μ_{ap} – Mobilidade Aparente

% α -A – Percentual de α -ácido

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	METABÓLITOS ESTUDADOS	24
2	OBJETIVOS	25
2.1	GERAL	25
2.2	ESPECÍFICOS	25
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
3.1	ELETROFORESE CAPILAR	26
3.2	CROMATOGRAFIA GASOSA	26
3.3	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	27
3.4	ABORDAGENS QUIMIOMÉTRICAS	28
3.4.1	Pré-processamento de dados brutos	30
3.4.2	Seleção de variáveis	32
4	HUMULONAS E LUPULONAS	34
4.1	CZE EM ASSOCIAÇÃO COM ABORDAGEM QUIMIOMÉTRICA PARA CLASSIFICAÇÃO DO POTENCIAL AMARGOR DE LÚPULOS	35
4.1.1	Parte experimental	36
4.1.1.1	Reagentes e amostras	36
4.1.1.2	Parâmetros de análise no CE	38
4.1.1.3	Extrações	40
4.1.1.4	Quimiometria	41
4.1.2	Resultados e discussões	41
4.1.2.1	Otimização das condições eletroforéticas	41
4.1.2.2	Otimização da extração	43
4.1.2.3	Classificação dos lúpulos	47
4.1.3	Conclusão	57
4.2	SEPARAÇÃO EM LINHA DE BASE DOS HOMÓLOGOS E ISÔMEROS DAS HUMULONAS E LUPULONAS EM LÚPULO POR CD-MEKC-UV	58
4.2.1	Parte experimental	59
4.2.1.1	Reagentes soluções e amostras	59
4.2.1.2	Extração	60
4.2.1.3	Instrumentação	61
4.2.1.4	Otimização dos parâmetros instrumentais de CE	62
4.2.2	Resultados e discussão	63
4.2.2.1	Otimização do BGE	63
4.2.2.2	Otimização instrumental	68
4.2.2.3	Estado da arte em separação de α e β -ácidos	72
4.2.2.4	Aplicando o método otimizado por CD-MEKC a outras variedades de lúpulo	79
4.2.3	Conclusão	83
5	TERPENOS	84
5.1	DETERMINAÇÃO DE TERPENOS EM LÚPULOS POR GC-MS E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS EMPREGANDO MODELAGEM MULTIVARIADA	84
5.1.1	Parte experimental	85
5.1.1.1	Reagentes e amostras	85
5.1.1.2	Extrações	86

5.1.1.3	<i>Parâmetros instrumentais</i>	87
5.1.2	Resultados e discussões	88
5.1.2.1	<i>Comparação dos métodos de extração</i>	88
5.1.2.2	<i>Comparação dos perfis aromáticos de lúpulos de diferentes variedades</i>	94
5.1.3	Conclusão	103
6	ÁCIDOS GRAXOS	105
6.1	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO LÚPULO POR GC-FID	106
6.1.1	Parte experimental	107
6.1.1.1	<i>Reagentes, soluções e amostras</i>	107
6.1.1.2	<i>Preparo de amostras</i>	107
6.1.1.2.1	<i>Extrações</i>	107
6.1.1.2.2	<i>Reações de transesterificação</i>	108
6.1.1.3	<i>Condições instrumentais</i>	109
6.1.2	Resultados e discussão	110
6.1.2.1	<i>Otimização do preparo de amostras</i>	110
6.1.2.2	<i>Análise das amostras</i>	112
6.1.3	Conclusão	120
6.2	DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS MAJORITÁRIOS EM AMOSTRAS DE LÚPULO POR ¹ H NMR ASSOCIADO A MODELAGEM QUIMIOMÉTRICA COM SELEÇÃO DE VARIÁVEIS	121
6.2.1	Parte experimental	122
6.2.1.1	<i>Preparo de amostras</i>	122
6.2.1.2	<i>Condições instrumentais</i>	123
6.2.1.3	<i>Modelagem multivariada</i>	124
6.2.2	Resultados e discussões	126
6.2.2.1	<i>Análise qualitativa dos espectros</i>	126
6.2.2.2	<i>Estruturação do protocolo de modelagem</i>	128
6.2.2.3	<i>Modelagem dos AG no lúpulo por siPLS</i>	134
6.2.3	Conclusão	137
6.3	DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS PALMÍTICO, ESTEÁRICO, OLEICO E LINOLEICO EM LÚPULOS POR CZE-UV	138
6.3.1	Parte experimental	139
6.3.1.1	<i>Reagentes e amostras</i>	139
6.3.1.2	<i>Preparo de amostras</i>	140
6.3.1.2.1	<i>Reação de saponificação</i>	140
6.3.1.3	<i>Parâmetros instrumentais</i>	141
6.3.1.4	<i>Validação</i>	142
6.3.2	Resultados e discussões	142
6.3.2.1	<i>Otimização do preparo de amostras</i>	142
6.3.2.2	<i>Validação</i>	145
6.3.2.3	<i>Aplicação do método validado a diferentes amostras de lúpulo</i>	151
6.3.3	Conclusão	153
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	155
	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	156

1 INTRODUÇÃO

Humulus lupulus L. é o nome botânico da planta trepadeira dioica popularmente conhecida como lúpulo. Do ponto de vista taxonômico, o gênero *Humus* pertencente à família Cannabaceae, da ordem das Urticales, mas que em 2003 foi incorporada à ordem Rosales (VAN CLEEMPUT et al., 2009). Uma curiosidade é que além do gênero *Humulus*, o único outro gênero pertencente a esta família é a *Cannabis*, cuja *Cannabis Sativa* é a única representante (ALMAGUER et al., 2014).

A história data o aparecimento do lúpulo no primeiro século antes de Cristo. Inicialmente, o lúpulo era utilizado como uma planta de jardim cujo principal objetivo era de ornamentação, mas também se apresentava com finalidades alimentícias, sendo ingerido como um tipo de aspargo (VERZELE; DE KEUKELEIRE, 1991). No entanto, somente no século IX iniciou-se o cultivo dessa planta em monastérios, principalmente para finalidades medicinais (MOIR et al., 2018). Com o passar dos anos, descobriu-se outros usos para o lúpulo, incluindo seu principal destino, a indústria cervejeira. Existem várias vertentes de discussão a respeito do primeiro uso do lúpulo como aditivo crucial para a produção de cerveja, mas pesquisadores datam o ano de 822, quando monges da Picardia fundaram o cluster de Corbay no norte da Alemanha (VERZELE; DE KEUKELEIRE, 1991).

O lúpulo é uma comódite em várias partes do mundo. O cultivo do lúpulo tem como principal motivo seu extenso uso no processo de produção de cervejas, sendo seu principal destino a indústria cervejeira. Muitos países cultivam lúpulo, principalmente na Europa, no noroeste dos Estados Unidos da América (EUA), na Austrália, na Nova Zelândia, na África do Sul e na China, enquanto que os principais produtores são Alemanha e EUA. A produção de lúpulo é geralmente limitada a regiões com latitude entre 35° e 55° em ambos hemisférios, sendo essa uma planta sensível à temperatura e à duração do dia para um crescimento ótimo (ROSSINI et al., 2016). No Brasil, grande parte do produto que abastece as empresas que fornecem insumos para a indústria cervejeira é oriundo de importação.

A indústria cervejeira é o alvo de cerca de 97% de todo cultivo mundial do lúpulo (ALMAGUER et al., 2014). O processo de produção de cerveja é segmentado e as etapas são as mesmas tanto para as convencionais industrializadas, quanto para as chamadas artesanais. Os principais ingredientes que levarão ao produto final conhecido como cerveja são: água, malte, lúpulo e levedura (KUCK, 2008). O lúpulo é adicionado

ao processo na etapa conhecida como fervura do mosto, sendo esse mosto o produto da interação dos grãos malteados secos e triturados com água aquecida durante determinado tempo com temperatura controlada; à etapa de produção do mosto dá-se o nome de mosturação ou brasagem (KUCK, 2008; REINOLD, 2009). Após a adição do lúpulo, no início da etapa de fervura, são extraídos os principais compostos relacionados ao aroma e sabor da cerveja (REINOLD, 2009), assim elucidando seu valioso papel na indústria cervejeira. Para algumas receitas cervejeiras o lúpulo também pode ser adicionado no fim da etapa de fervura com o objetivo de produzir cervejas especiais mais aromatizadas. Os compostos que conferem o aroma e sabor característicos das cerveja são metabólitos secundários da planta lúpulo.

A riqueza e complexidade química dessa planta tem atraído a atenção de muitos pesquisadores. Muitos compostos encontrados no lúpulo, dentre metabólitos primários e secundários, já são conhecidos. Na Tabela 1 é mostrada a composição básica do lúpulo. Os compostos responsáveis pelo aroma e sabor amargo da cerveja são os óleos essenciais e os iso- α -ácidos, respectivamente. Durante a etapa de fervura do mosto cervejeiro com adição de lúpulo esses compostos são extraídos e gerados. No caso do amargor, os iso- α -ácidos são os responsáveis, sendo que seus precursores, os α -ácidos, são os compostos presentes no lúpulo. Essa transformação dos α -ácidos a iso- α -ácidos ocorre através de um processo de isomerização catalisada por aquecimento (JASKULA; AERTS; DE COOMAN, 2010; KHATIB et al., 2010). Já o aroma característico é conferido principalmente pelo óleo essencial, cuja constituição básica são terpenos.

Tabela 1: Componentes majoritários presentes no lúpulo

Majoritários	Concentração (% m/m)
Celulose + Lignina	40,0-50,0
Proteínas	15,0
α -Ácidos	2,0-17,0
β -Ácidos	2,0-10,0
Água	8,0-12,0
Mineirais	8,0
Polifenóis e Taninos	3,0-6,0
Lipídeos e Ácidos Graxos	1,0-5,0
Óleo	0,5-3,0
Monossacarídeos	2,0
Pectina	2,0

Fonte: (EUROPEAN BREWING CONVENTION, 1997)

É importante destacar que a demanda de produção de lúpulo pode ser vista de maneira indireta através da produção e consumo de cerveja. O Brasil ocupa a terceira posição no ranking mundial de produção de cerveja (SINDICERV, 2018), produzindo aproximadamente 14 bilhões de litros em 2016 (BRASIL, 2017). A indústria cervejeira corresponde hoje a cerca de 1,6% do PIB nacional, além de ser um dos setores que mais empregam no país, gerando em torno de 2,2 milhões de empregos (BRASIL, 2017).

Além da indispensabilidade do lúpulo na indústria cervejeira, outras aplicações são encontradas para essa planta, como na medicina (CHADWICK; PAULI; FARNSWORTH, 2006; MASEK et al., 2014; SCHAEFER et al., 2005; TYRRELL et al., 2010), em ornamentação (DELYSER; KASPER, 1994), culinária e cosmética (MOIR et al., 2018).

1.1 METABÓLITOS ESTUDADOS

Dentre a rica gama de metabólitos biosintetizados pelo lúpulo, uma classe de metabólitos primários e duas classes de metabólitos secundários foram estudadas com o viés analítico nesse trabalho. Considerando os metabólitos secundários, a primeira classe de compostos avaliada foi a dos acil-floroglucinols prenilados, representados pelas Humulonas e Lupulonas, popularmente conhecidas como α e β -ácidos, respectivamente (CHADWICK; PAULI; FARNSWORTH, 2006; KAVALIER et al., 2011). A segunda classe de metabólitos secundários foram os terpenos, sendo esses os principais constituintes do óleo essencial da planta. Por fim, os ácidos graxos (AG), metabólitos primários, foram também avaliados no lúpulo. É importante ressaltar que o interesse em estudar essas classes de compostos no lúpulo surge, principalmente, em decorrência de seus importantes papéis no processo de produção de cervejas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Essa tese tem como cerne o desenvolvimento e/ou aplicação de métodos analíticos para identificação e/ou quantificação de compostos pertencentes às classes α e β -ácidos, terpenos e AG em diferentes variedades de lúpulos comerciais.

2.2 ESPECÍFICOS

- Trabalhar com diferentes técnicas analíticas, como a Eletroforese Capilar (sigla do inglês, CE), as Cromatografias Gasosa com Detecção por Ionização em Chama e acoplada ao Espectrômetro de Massas (siglas do inglês, GC-FID e GC-MS respectivamente), bem como a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (sigla do inglês, NMR);
- Otimizar parâmetros inerentes às técnicas analíticas utilizadas;
- Avaliar diferentes métodos de extração dos analitos a partir do lúpulo;
- Aplicar os métodos desenvolvidos em diferentes variedades de lúpulos comerciais;
- Avaliar diferentes pré-tratamentos de dados como etapa prévia à modelagem multivariada;
- Utilizar métodos multivariados como Análise de Componentes Principais (sigla do inglês, PCA) e a Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (sigla do inglês, PLS) para reconhecimento de padrões e calibração, respectivamente.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ELETROFORESE CAPILAR

CE é uma técnica de separação, que opera em meio líquido e é baseada na migração diferenciada de íons solvatados, espécies ionizáveis ou neutras, em função de suas razões carga/tamanho, quando um campo elétrico da ordem de $\pm kV$ é aplicado a uma coluna capilar preenchido internamente com uma solução de eletrólito conveniente (OLIVEIRA et al., 2016; TAVARES, 1996). Dentre os vários modos de CE disponíveis, levando-se em consideração as características químicas dos analitos a serem investigados, foram empregadas a eletroforese capilar de zona (sigla do inglês, CZE), a cromatografia electrocinética micelar (sigla do inglês, MEKC) (SIMAS VAZ; MARTA DE OLIVEIRA; LEAL DE OLIVEIRA, 2015) e a MEKC modificada com ciclodextrina (sigla do inglês, CD-MEKC) (HIROYUKI; TERABE, 1996). Em MEKC, por definição, é adicionado um surfactante iônico ao eletrólito em uma concentração superior à concentração micelar crítica (CMC) e então micelas são formadas. Logo, seja por MEKC ou por CD-MEKC, os analitos além de terem a diferença intrínseca de carga e tamanho que fornece a cada um deles uma mobilidade eletroforética (μ_{ep}), nesses casos ainda se tem a vantagem da interação diferenciada com essas pseudo-fases estacionárias formadas, seja por uma micela ou por um composto de inclusão tipo a CD, o que pode conferir ao método uma maior seletividade (TERABE, 2009).

3.2 CROMATOGRAFIA GASOSA

Na cromatografia gasosa (sigla do inglês, GC) os componentes de uma amostra vaporizada se separam como consequência da partição entre uma fase móvel (FM) gasosa, que se trata de um gás inerte e uma fase estacionária (FE) contida em uma coluna. A eluição dos constituintes de uma amostra injetada em um sistema injetor programado em alta temperatura se dá mediante ao fluxo da FM, também chamado de gás de arraste (SKOOG; HOLLER; CROUCH, 2008). A GC tem um excelente poder de resolução, tornando possível a separação e identificação de dezenas de substâncias de uma amostra simultaneamente em uma única corrida cromatográfica. Além disso, essa é uma técnica de excelente sensibilidade, dependendo do sistema de detecção acoplado (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

Dentre uma gama de possibilidades de detectores que podem ser encontrados nos sistemas de GC, destacam-se o detector por ionização em chama (do inglês, FID –

flame ionization detector) e a hifenação com a técnica de espectrometria de massas (do inglês, MS – *mass spectrometry*). O FID é um dos detectores mais amplamente utilizados em GC, devido principalmente à sua elevada sensibilidade e eficiência para detecção de compostos orgânicos. Esse sistema é baseado na captação da corrente elétrica gerada por íons e elétrons formados após a aplicação de uma diferença de potencial nas extremidades de um queimador contendo os efluentes da coluna cromatográfica combinados à mistura de gases H₂/Ar. No entanto, o FID só permite detectar os analitos, sendo necessário o uso padrões analíticos para a confirmação dos compostos de interesse (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2001). Já nos sistemas em que a MS é empregado, é possível detectar e identificar os compostos com base nos espectros de massas gerados.

No sistema de GC-MS o fluido que elui da coluna cromatográfica carregado pela FM, agora constituída por gás Hélio, vai direto para uma câmara onde ocorre a ionização por impacto de elétrons (70 eV). Os compostos são identificados com base na relação massa-carga (m/z) dos íons gerados em fase gasosa após passarem por um seletor de massas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2001), sendo o quadrupolo o mais comum deles. Quando acoplado ao GC, o sistema de MS permite a distinção de massas da ordem de 5 a 10 ppm, o que faz com esse sistema seja muito sensível e amplamente utilizado para análises de amostras complexas (KITSON; LARSEN; MCEWEN, 1996).

3.3 ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Nesse trabalho foi utilizada a espectroscopia de ressonância magnética nuclear para o núcleo de hidrogênio (sigla do inglês, ¹H NMR – *proton nuclear magnetic resonance*). Essa técnica, como outras abordagens espectroscópicas, se baseia na interação entre radiação eletromagnética e matéria. Nesse caso, os núcleos de hidrogênio absorvem a energia fornecida por uma radiação eletromagnética com frequência na região de radiofrequência quando a amostra é submetida a ação de um campo magnético externo.

Após a aplicação do campo magnético externo o movimento de precessão dos núcleos de hidrogênio (spin ½) começa a ocorrer com determinada frequência angular, sendo que o vetor do campo magnético gerado nos núcleos de hidrogênio se alinha com o vetor do campo magnético aplicado (externo). Assim que o fóton com frequência

definida encontra o núcleo de hidrogênio precessando com a mesma frequência, ocorre o fenômeno de ressonância (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

No espectrômetro pulsado, a amostra é irradiada com pulsos de radiofrequência de alta potência sob a ação do campo magnético externo, o que permite a excitação simultânea de todos os núcleos de hidrogênio da amostra. Após o relaxamento, é produzido o decaimento livre de indução no domínio do tempo, este que é convertido para o domínio da frequência pela transformada de Fourier. Os sinais dos hidrogênios em diferentes ambientes químicos são gerados levando em consideração um referencial interno (normalmente o tetrametilsilano) e a frequência de operação do equipamento (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

3.4 ABORDAGENS QUIMIOMÉTRICAS

A quimiometria está consolidada com suas aplicações nos mais diversos campos da ciência. Considerando o contexto de química analítica, com a modernização das técnicas instrumentais e suas utilizações para estudos de matrizes complexas, a geração de muitos e complexos dados é quase inevitável, o que torna imprescindível o emprego de ferramentas de análise multivariada.

Seja na etapa prévia à aquisição dos dados, em que no contexto de otimização de um processo deseja-se avaliar a influência de uma ou mais variáveis sobre a variável de interesse ou numa etapa pós-aquisição de dados, em que busca-se avaliar mais de uma resposta ao mesmo tempo, a abordagem multivariada é de grande interesse para químicos analíticos funcionando como uma importante ferramenta auxiliar.

Nesse trabalho foram empregadas abordagens multivariadas para otimização de processos como o planejamento de experimentos, para classificação de amostras, como a análise de componentes principais (sigla do inglês, PCA – *Principal Component Analysis*) e para quantificação como a regressão por mínimos quadrados parciais (sigla do inglês, PLS – *Partial Least Squares*).

Realizou-se o planejamento experimental tipo Box-Behnken 3^3 (três fatores em três níveis) com triplicata no ponto central, visto que nesse planejamento são realizados um número menor de ensaios que no fatorial completo, além de permitir a modelagem por superfície de respostas. Essa abordagem foi empregada para a otimização dos

parâmetros instrumentais na otimização de um método por CD-MEKC para a separação completa dos isômeros e homólogos dos α e β -ácidos.

A PCA foi realizada em mais de uma vertente do trabalho para classificação de lúpulos de diferentes variedades a partir de diferentes informações instrumentais. Na subseção 4.1 foram usados os perfis eletroforéticos dos extratos hidrometanólicos de lúpulo para a construção da matriz de dados utilizada na modelagem por PCA, enquanto que na subseção 5.1 foram usadas as concentrações dos terpenos obtidas por GC-MS como dados de entrada. A PCA consiste na decomposição da matriz de dados originais, \mathbf{X} , em uma soma de novas variáveis chamadas de componentes principais (sigla do inglês, PC), onde a PC1 detêm o maior percentual da variância explicada considerando as variáveis originais, seguido da PC2 (ortogonal à PC1) e assim por diante (BRERETON, 2003; MASSART et al., 1991). Essa matriz é construída agrupando as variáveis do sistema nas colunas, onde para o trabalho usando os perfis eletroforéticos (subseção 4.1) as informações de sinais referentes a cada incremento de tempo foram tomadas como variáveis, o que gerou uma matriz com 3000 colunas. Já para o trabalho com os terpenos (subseção 5.1), as informações de concentração oriundas da GC para 13 terpenos foram tomadas como as variáveis do sistema, o que gerou uma matriz muito menor, com apenas 13 colunas. Na linhas da matriz são alocadas as amostras. Logo, para o trabalho com os α -ácidos (subseção 4.1) uma matriz \mathbf{X} de ordem 32x3000 (32 amostras e 3000 variáveis) foi utilizada, enquanto que para o trabalho de classificação envolvendo o perfil terpênico (subseção 5.1), uma matriz \mathbf{X} de ordem 32x13 (32 amostras e 13 variáveis) foi empregada.

A PLS foi utilizada na subseção 6.2 para construção de modelos de calibração multivariada para determinação dos ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), eicosanóico (C20:1), eicosadienóico (C20:2) e docosadienóico (C22:2) em lúpulos. Assim como na PCA, na PLS é utilizada uma matriz \mathbf{X} , agora contendo as informações do método proposto como alternativo a um determinado método de referência. Se tratando de calibração multivariada, normalmente são propostos métodos por espectroscopia, visto que em geral eles não são destrutivos, necessitam de uma pequena quantidade de amostras, necessitam de pouco ou nenhum preparo de amostras e são mais rápidos que os de referência (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008). Como na PCA, as amostras são agrupadas nas linhas da matriz \mathbf{X} , enquanto que as variáveis ficam nas colunas. Para a construção dos

modelos de calibração multivariada para os AG anteriormente citados, a matriz \mathbf{X} apresentou a dimensão 30x39330. A diferença do PLS para a PCA é que como o objetivo é determinar um parâmetro, as informações de um método de referência são necessárias. Nesse caso, as informações quantitativas de cada AG foram oriundas da GC-FID, cujos resultados são apresentados na subseção 6.1. Como se tratou do método multivariado conhecido como PLS1, onde cada parâmetro é determinado por um modelo (Andersson, 2009), as informações quantitativas para cada AG foram agrupadas em um vetor \mathbf{y} de dimensão 30x1. Na PLS tanto a matriz \mathbf{X} , quanto a \mathbf{y} são decompostas em uma soma de variáveis latentes (sigla do inglês, LV – *Latent Variables*) e essas duas matrizes apresentam uma relação linear entre si (Wold *et al.*, 2001).

Um ponto a ser destacado é que nem sempre a informação oriunda da técnica instrumental utilizada para lidar com o problema estudado está apta a ser modelada, por mais que se tenha tido todo rigor analítico na etapa experimental e tenha sido empregado um método otimizado. A resposta instrumental consiste da informação química acrescida de variações sistemáticas e aleatórias. Isso leva a perturbações nos sinais analíticos, muitas vezes expressos como ruídos, estes que podem influenciar negativamente na performance da modelagem quimiométricas, visto que os modelos são muito sensíveis às pequenas variações de sinais. Nesse sentido, uma etapa conhecida como pré-processamento dos dados se torna indispensável para a maioria das aplicações envolvendo dados químicos para finalidades analíticas, quando abordagens quimiométricas são empregadas (RINNAN; BERG; ENGELSEN, 2009). Uma atenção especial a essa etapa será dada na subsubseção 3.4.1.

3.4.1 Pré-processamento de dados brutos

Três importantes etapas que devem ser avaliadas suas necessidades previamente à modelagem quimiométrica propriamente dita são: o alinhamento, o ajuste ou correção do sinal analítico e a seleção de variáveis (discutida na próxima subseção).

O alinhamento é mandatório quando se tem o propósito de construir modelos multivariados utilizando alguns tipos de sinais instrumentais, como por exemplo dados de natureza eletroforética/cromatográfica ou de NMR. Quando se trata do processamento de sinais provenientes de sistemas analíticos de separação sabe-se que deslocamentos nos tempos de retenção ou migração podem ocorrer por diversos fatores

controláveis, como é o caso de mudanças em parâmetros como temperatura e voltagem, ou incontroláveis, isto é, parâmetros inerentes ao sistema (KARABIBER, 2013). Mesmo quando se tem todos os parâmetros controláveis mantidos constantes, variações nos tempos de retenção ou migração de um ou mais analitos acontecem frequentemente em uma análise de rotina. No caso de dados de NMR, as variações nos sinais podem ocorrer devido a pequenas mudanças de pH e por conta de interações intermoleculares, principalmente se tratando de matrizes complexas (SAVORANI; TOMASI; ENGELSEN, 2010).

Alguns métodos de alinhamento são encontrados na literatura, como é o caso do COW (sigla do inglês para *Correlation Optimised Warping*) (NIELSEN; CARSTENSEN; SMEDSGAARD, 1998) e do icoshift (sigla do inglês para *interval correlation optimised shifting*) (TOMASI; SAVORANI; ENGELSEN, 2011), sendo esse último o método usado no presente trabalho. O algoritmo icoshift usa uma função de correção linear, que trabalha por partes, com base em um modelo de inserção/exclusão e otimiza a correlação cruzada por partes usando um método chamado de FFT (sigla do inglês para *Fast Fourier Transform*), que é um algoritmo inteligente que permite a recursividade definida pelo usuário. O algoritmo não depende de procedimentos automáticos, mas ao invés disso ele é baseado em procedimentos de segmentação básica ou na experiência do analista na identificação dos picos ou nas regiões a serem alinhadas.

Outra abordagem de pré-processamento após o alinhamento é a tentativa de melhorar o ajuste dos dados, cujo objetivo é deixar os dados originais “mais limpos”, tornando a informação de interesse mais evidente, o que implica em um aumento notório da razão sinal-ruído (ENGEL et al., 2013). Métodos de suavização de sinais são interessantes para essa finalidade, estes que tem o principal objetivo de remover ou pelo menos reduzir os sinais indesejáveis, também conhecidos como artefatos, objetivando alcançar modelos quimiométricos mais eficientes (LEE; LIONG; JEMAIN, 2017). O método de suavização de sinal testado nos trabalhos aqui apresentados foi o filtro derivativo Savitzky-Golay (SG), em que os sinais são previamente modelados por funções polinomiais, seguida da aplicação do filtro derivativo o que permite a diminuição dos ruídos e correção da linha base (SAVITZKY; GOLAY, 1964a)

Centrar os dados na média é o tipo de pré-processamento mais simples e muito utilizado, este que consiste em apenas subtrair cada variável (ponto a ponto) da média

de seu vetor. O autoescalamento é um método de escalonamento utilizado para equalizar variáveis, uma vez que estas podem ser encontradas em unidades diferentes ou até mesmo em consideráveis diferenças de escala. Por exemplo, se tratando de dados eletroforéticos, apesar dos picos estarem na mesma escala, se houver o interesse de se utilizar todo o sinal em uma situação em que haja uma diferença discrepante na intensidade dos picos, equalizar os sinais autoescalando pode ser uma interessante estratégia para se trabalhar com os dados, dando o mesmo peso a todas variáveis (GEMPERLINE, 2006; MONAKHOVA; TSIKIN; MUSHTAKOVA, 2016). Outro método de escalonamento que também foi testado é o pareto, que matematicamente é muito semelhante ao autoescalamento, mas ao invés de usar o desvio padrão como fator de escala, o quadrado do desvio padrão é utilizado (MONAKHOVA; TSIKIN; MUSHTAKOVA, 2016; VAN DEN BERG et al., 2006).

O método de transformação SNV também foi testado (sigla do inglês para *standard normal variate transform*), sendo este principalmente usado para dados espectroscópicos, visto que ele permite corrigir variações na linha de base gerados em decorrência de efeitos de espalhamento de radiação e de diferença em tamanhos de partículas (BARNES; DHANOA; LISTER, 1989).

3.4.2 Seleção de variáveis

A avaliação da necessidade de se usar toda a informação gerada pela técnica instrumental utilizada é uma importante etapa do processo de modelagem multivariada. Muitas vezes, trabalhar com um número menor de variáveis é uma estratégia muito eficiente e essa redução pode ser feita basicamente de duas formas: seja por uso de ferramentas de seleção de variáveis ou por recortes direcionados do sinal gerado, realizado pelo analista devido ao conhecimento dos dados (ANDERSEN; BRO, 2010; BALABIN; SMIRNOV, 2011; MALLI; NATSCHLÄGER, 2015). Métodos de seleção de variáveis são mais usuais quando se trabalha com dados espectrais de amostras complexas e a informação de interesse se encontra misturada em meio a muitas outras. Esses métodos podem ser realizados por uma varredura sistemática (NØRGAARD et al., 2000a) ao longo de toda informação ou podem ser feitos por métodos baseados em alguma informação prévia do sistema, sendo estes muitas vezes baseados em princípios evolucionistas como é o caso da aplicação de algoritmo genético (LEARDI, 2001). Para o trabalho envolvendo calibração multivariada para determinação dos AG nos lúpulos

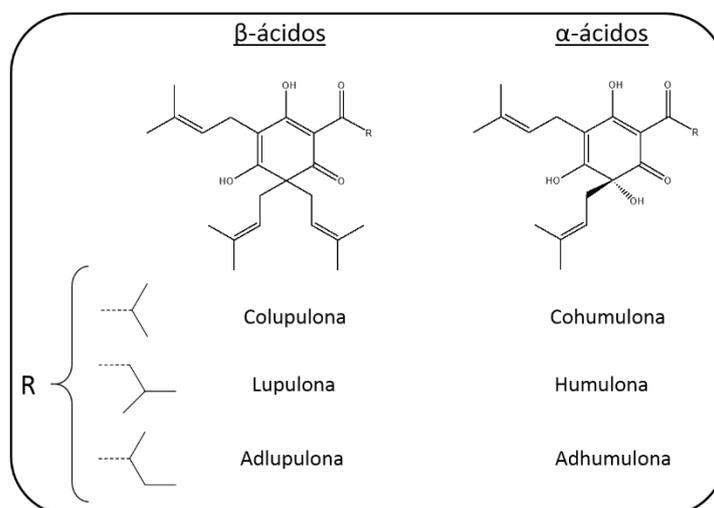
(subseção 6.2) foram utilizados os métodos de varredura sistemática por intervalos, conhecido como iPLS (sigla do inglês para *interval* PLS) e por sinergismo de intervalos, conhecido como siPLS (sigla do inglês para, *synergism* iPLS). Nessas duas abordagens, a informação de entrada (o conjunto espectral) é segmentada em um número de intervalos designado pelo usuário e, então, é calculado um modelo PLS em cada um desses intervalos. O parâmetro de comparação dos modelos gerados é a raiz quadrada do erro quadrático médio de validação cruzada (sigla do inglês, RMSECV – *root mean squares error for cross validation*).

Por outro lado, também é possível reduzir os dados de entrada ou selecionar faixas de trabalho baseando-se no conhecimento da informação gerada, como ocorreu no caso do trabalho envolvendo a aplicação de CZE nos extratos hidrometanólicos do lúpulo para identificação dos α -ácidos (subseção 4.1). Nesse caso, a informação eletroforética é por natureza “mais limpa” que uma informação espectroscópica, visto que todo desenvolvimento do método eletroforético direciona o resultado para a informação do analito. Sendo assim, selecionar a região dos picos referentes aos analitos podem fornecer uma informação mais simples de ser tratada quimiometricamente que pode gerar um modelo de reconhecimento de padrões com maiores percentuais de variância explicada nas componentes principais (do inglês, PCs). Dessa forma, nesse trabalho foram usadas informações de todo eletroferograma e também da região de migração dos analitos a partir de seleção direcionada com base no conhecimento do analista, com o intuito de avaliar os melhores dados para a realização da modelagem quimométrica.

4 HUMULONAS E LUPULONAS

O valor do lúpulo é principalmente atribuído às classes de compostos que levam ao aroma e sabor característicos da cerveja. O aroma é fornecido pelo óleo essencial da planta, esse que é basicamente constituído de terpenos. Os acil-floroglucinóis prenilados, mais conhecidos como α e β -ácidos, ou também Humulonas e Lupulonas (CHADWICK; PAULI; FARNSWORTH, 2006; KAVALIER et al., 2011), são metabólitos secundários biosintetizados na glândula lupulina da planta fêmea do lúpulo (ALMAGUER et al., 2014; STEENACKERS; DE COOMAN; DE VOS, 2015). As estruturas moleculares dos α e β -ácidos são mostradas na Figura 1.

Figura 1: Estruturas moleculares dos α e β -ácidos



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os α -ácidos são formados pela Humulona, Adhumulona e Cohumulona, sendo esses os constituintes mais importantes das resinas. Considerando o processo de produção de cerveja, esses compostos são precursores do amargor da cerveja (ALMAGUER et al., 2014). Durante a etapa de fervura do mosto o lúpulo é adicionado ao processo, os α -ácidos são extraídos e termicamente convertidos a iso- α -ácidos por um processo de isomerização. Os iso- α -ácidos são os compostos responsáveis pelo amargor da cerveja (JASKULA; AERTS; DE COOMAN, 2010; KHATIB et al., 2010). Os β -ácidos também são formados por três compostos, sendo eles a Lupulona a Adlupulona e a Colupulona. Ao contrário dos α -ácidos, os β -ácidos não contribuem para o amargor da cerveja. O processo de isomerização não ocorre para as lupulonas por elas não possuírem a porção α -hidroxicetona no carbono seis (C6) (MOIR et al., 2018), em

virtude da substituição desse grupo por uma prenila a mais (VAN CLEEMPUT et al., 2009). Em virtude da presença de um substituinte mais hidrofóbico no C6, a solubilidade dos β -ácidos é menor, o que contribui para a ausência desses compostos na cerveja. No entanto, essa prenila a mais nos β -ácidos conferem a eles uma maior atividade antimicrobiana (SIRAGUSA et al., 2008; STEENACKERS; DE COOMAN; DE VOS, 2015). Outra informação importante é o pKa dos α -ácidos, estes variam de 5-5,5, sendo a cohumulona o composto mais ácido dos três α -ácidos (JASKULA-GOIRIS; GUIDO, 2010).

4.1 CZE EM ASSOCIAÇÃO COM ABORDAGEM QUIMIOMÉTRICA PARA CLASSIFICAÇÃO DO POTENCIAL AMARGOR DE LÚPULOS

Existem na literatura vários trabalhos lidando com o desenvolvimento de métodos para determinação de α e β -ácidos em lúpulos, principalmente por cromatografia a líquido de alta eficiência (sigla do inglês, HPLC) com detecção no ultravioleta/visível (CULIK et al., 2009; JASKULA et al., 2007; ROJ et al., 2015; VERZELE; DYCK; CLAUS, 1980a), por espectrometria de massas (sigla do inglês, MS) (CESLOVÁ et al., 2009; HOFTE; HOEVEN, 1998), ou ambos (HASELEU; INTELMAAN; HOFMANN, 2009; KAO; WU, 2013) e, até mesmo, por NMR (PUSECKER; ALBERT; BAYER, 1999). Alternativamente a HPLC, a CE é uma interessante técnica analítica para esse tipo de análise devido a sua alta eficiência, baixo tempo de análise e por requerer pequenos volumes de solventes e amostras (CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2003). Também foram encontrados na literatura estudos que visaram o desenvolvimento de métodos para essa finalidade por CE-UV (KORNYSOVA et al., 2009), por CE-MS (ARRÁEZ-ROMÁN et al., 2006; VILLALBA et al., 2006) e por MEKC com detecção no UV (MEKC-UV) (ROYLE et al., 2001; VINDEVOGEL; SANDRA; VERHAGEN, 1990).

Existem vários tipos de lúpulo. Dessa forma, além de desenvolver métodos que permitam a determinação dos principais compostos, uma classificação dessas diferentes plantas é importante visto que elas são utilizadas para diferentes propósitos considerando a aromatização e amargor da cerveja. Farag *et al.* trabalharam com NMR, ESI(-)-FTICR-MS e LC-MS na tentativa de entender e identificar o perfil dos metabólitos do lúpulo a partir de uma análise *fingerprint* com auxílio modelagem por PCA (FARAG et al., 2012). Dois trabalhos mais recentes também envolveram o uso

PCA para classificação, o primeiro usando NMR bidimensional (HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) (FARAG et al., 2014) e o segundo aplicando espectroscopia Raman juntamente com NMR (KILLEEN et al., 2017). No entanto, de acordo com a pesquisa bibliográfica realizada, não foram encontradas abordagens envolvendo uma classificação do potencial amargor de diferentes variedades lúpulos utilizando dados oriundos de técnicas de separação como dados de entrada para a modelagem quimiométrica, muito menos considerando dados de CE. Outro importante ponto dessa parte do trabalho é a investigação do pré-processamento do sinal eletroforético como uma etapa prévia à modelagem quimiométrica. Esse tipo de abordagem é mais comum de ser encontrado quando CE é aplicada em estudos de metabolômica (GARCÍA-PÉREZ et al., 2008; SZYMAŃSKA et al., 2007), sendo os métodos de alinhamento para os eletroferogramas os mais discutidos (KOK et al., 2014; NEVEDOMSKAYA et al., 2009).

Nesse contexto, essa parte do trabalho traz a otimização dos métodos de extração e eletroforético para detecção dos α -ácidos no lúpulo a fim de utilizar o perfil eletroforético característico de cada lúpulo para construir um modelo de reconhecimento de padrões que permita classificar diferentes lúpulos de acordo com seu potencial amargor levando em consideração o teor de α -ácidos (% α -A). Foi mostrado que o uso de padrões analíticos não foi necessário para a classificação, o que torna a abordagem mais interessante. Para tanto, uma avaliação sistemática do pré-processamento de dados foi feita levando em consideração as etapas de alinhamento, correção de linha base e suavização de ruídos e seleção de variáveis.

4.1.1 Parte experimental

4.1.1.1 Reagentes e amostras

Todos os reagentes utilizados foram obtidos em grau analítico. Trabalhou-se com água deionizada, sendo essa purificada por um sistema de osmose reversa (Millipore, Bedford, MA, EUA). Carbonato de amônio foi adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), enquanto que metanol (MeOH), acetona e hidróxido de sódio (NaOH) da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Uma solução estoque de carbonato de amônio na concentração de 320 mmol L⁻¹ foi preparada e estocada a 4 °C e a cada dia de trabalho foi realizada a diluição desta com água deionizada para a preparação do

eletrólito de corrida constituído de 160 mmol L⁻¹ de carbonato de amônio (pH 9). Uma solução estoque de NaOH 1,0 mol L⁻¹ foi preparada para o condicionamento do capilar.

As amostras de lúpulo de diferentes variedades (Tabela 2) se encontravam em pellets, devidamente fechadas sob vácuo e após recebidas foram mantidas em temperatura de -20 °C até sua utilização para extração e análise. Dezesesseis amostras foram preparadas e analisadas em duplicata genuína, o que totalizou trinta e duas amostras de trabalho. Os resultados instrumentais gerados por essas amostras de trabalho foram utilizados para a construção de modelos de reconhecimento de padrão não-supervisionados. As amostras foram fornecidas pela empresa Muller Empório do Malte, localizada na cidade de Juiz de Fora, MG.

Na Tabela 2 são mostradas as variedades de lúpulo usadas, juntamente com a massa de cada duplicata genuína, os percentuais de α -ácidos (% α -A), estes que são relacionados com o total de α -ácidos presentes em cada amostra de lúpulo. É importante ressaltar que o % α -A diz respeito ao teor total dos homólogos e isômeros de α -ácidos, sendo esses: humulona, adhumulona e cohumulona. Lúpulos com valores mais elevados de % α -A apresentam maior potencial de amargor, enquanto que lúpulos com mais baixos de % α -A podem ser classificados como de aroma ou aromatizantes. Os métodos mais comuns para obtenção do teor total de α -ácidos em lúpulos são por espectrofotometria, por titulação condutométrica ou por HPLC (KORNYSOVA et al., 2009).

Tabela 2: Amostras de lúpulo em pellet com suas respectivas pesagens em duplicata e seus % α -A

Lúpulo	m ₁ ^a (mg)	m ₂ ^a (mg)	% α -A ^b
Tettnang (1 e 2) ^c	300,4	300,2	2,2
Fuggle (3 e 4)	300,2	300,4	5,0
Nugget (5 e 6)	300,2	300,8	10,5
Columbus (7 e 8)	300,2	300,1	15,3
Galena (9 e 10)	300,1	300,3	12,6
Saaz (11 e 12)	300,7	300,4	2,96
Citra (13 e 14)	300,7	300,3	12,6
Amarillo (15 e 16)	300,4	299,9	7,1
E. K. Golding (17 e 18)	300,1	300,4	5,7
Tradition (19 e 20)	300,5	300,1	3,8
Chinook (21 e 22)	299,9	300,1	10,8
Perle (23 e 24)	300,7	300,1	8,8
S. golding (25 e 26)	300,1	300,8	5,2
Hersbrucker (27 e 28)	300,7	299,8	2,5
Magnum (29 e 30)	299,9	300,1	12,1
Magnum (31 e 32)	300,5	300,1	12,1

^a m₁ e m₂ são as massas da duplicata

^b % α -A é o percentual de α -ácido fornecido pelo fabricante

^c códigos para identificação na análise da PCA

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

4.1.1.2 Parâmetros de análise no CE

Mais de um método para análise de α -ácidos por CE é reportado na literatura (CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2003; ROYLE et al., 2001; VILLALBA et al., 2006; VINDEVOGEL; SANDRA; VERHAGEN, 1990). A solução de composição do eletrólito (BGE, sigla do inglês para *Background Electrolyte*) foi carbonato de amônio a 160 mmol L⁻¹, pH 9 (VILLALBA et al., 2006) e os demais parâmetros instrumentais foram avaliados univariadamente a fim de obter a melhor separação dos analitos. As variáveis pressão de injeção no modo hidrodinâmico e voltagem foram avaliadas. As principais modificações nessas duas variáveis são mostradas na Tabela 3.

Tabela 3: Testes univariados para otimização dos parâmetros de CZE-UV para identificação dos α -ácidos

Teste	Parâmetro	Modificação
1	Voltagem	+25 kV
2		+20 kV
3		+18 kV
4	Pressão de injeção	50 mbar/5 s
5		25 mbar/5 s
6		20 mbar/5 s

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Outras variáveis instrumentais como temperatura do cartucho e frequência de pontos para construção do sinal eletroforético foram mantidas constantes com os valores 25 °C e 2,5 Hz, respectivamente. As corridas eletroforéticas foram realizadas em um capilar de sílica fundida externamente revestido com poliimida (Polymicro, Phoenix, AZ, EUA) com 50 e 375 μm de diâmetro interno (i.d.) e externo (o.d.), respectivamente. Considerando um novo capilar, foi feito um pré-condicionamento aplicando *flush* com NaOH 1,0 mol L⁻¹ durante 1800 s, seguido de água deionizada por 600 s e equilibrando o sistema com BGE durante 1200 s. Entre as corridas o capilar foi lavado aplicando *flush* com solução de NaOH 0,2 mol L⁻¹, água deionizada por 600 s e equilibrado com BGE, cada um durante 120 s.

Uma importante modificação realizada quando comparado com o trabalho de Villalba foi o comprimento total do capilar, este que foi reduzido de 100 cm para 62,5 cm (54,0 cm de comprimento efetivo). Os comprimentos de onda 210, 230, 250, 270, 300, 330 e 380 nm foram avaliados e foi decidido trabalhar em 230 nm, visto que foi obtido um maior sinal analítico para os α -ácidos. As análises foram realizadas em dois equipamentos de CE da marca Agilent, modelo 7100 (Palo Alto, EUA), localizados na Universidade Federal de Juiz de Fora e na Universidade Federal de São João Del-Rei, o segundo localizado no laboratório coordenado pelo professor Dr. Keyller Borges. O software HP ChemStation (rev A.06.01) foi utilizado para aquisição e tratamento de dados no sistema de CE.

4.1.1.3 Extrações

Na literatura são descritos alguns métodos de extração para análise de α -ácidos em lúpulo usando as técnicas de CE e HPLC (ARRÁEZ-ROMÁN et al., 2006; KORNYSOVA et al., 2009; VILLALBA et al., 2006). As principais diferenças encontradas nos métodos de extração foram a forma da planta, seja em cones, pellets ou pulverizado, a massa de amostra, o solvente extrator e o tempo de extração. Algumas modificações foram testadas inicialmente de modo univariado como são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4: Métodos de extração testados para identificação dos α -ácidos em amostras de lúpulo por CZE-UV

Extrações	SE ^a	t (min)	Rep ^b	m (mg)	Filtração/Secagem
EXT1	MeOH	180	1	292,1	Papel+Seringa (0,45 μ m)
EXT2	MeOH/H ₂ O 80:20	180	1	301,9	Papel + Seringa (0,45 μ m)
EXT3	MeOH/H ₂ O 50:50	180	1	300,9	Papel + Seringa (0,45 μ m)
EXT4	Acetona/H ₂ O 75:25	180	1	297,6	Vácuo + Seringa (0,45 μ m)
EXT5	Acetona/H ₂ O 75:25	10	1 ^c	300,1	Papel
EXT6	Acetona/H ₂ O 75:25	10	2 ^c	300,1	Papel + Seringa (0,45 μ m)

^a SE - Solução extratora

^b Rep – Réplicas

^c Utilizou-se 10 mL de solução extratora para cada replica de extração

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Para todos os testes, o sistema de extração foi montado em um béquer, pesando cerca de 300,0 mg de lúpulo previamente pulverizado, seguido da adição da solução extratora e uma barra magnética. Após tampar o béquer com o auxílio de um vidro relógio para que o solvente não fosse evaporado, a extração foi realizada sob contínua agitação (650 rpm) usando um agitador magnético.

4.1.1.4 Quimiometria

Os eletroferogramas dos extratos de lúpulo foram utilizados para comparação entre si a fim de alcançar um método que permita classificar amostras de lúpulo de acordo com as características de amargor. Para tanto, utilizou-se a abordagem multivariada devido ao grande e complexo conjunto de dados gerados. Como apresentado na subsubseção 3.4.1, o pré-processamento é uma importante etapa prévia à modelagem quimiométrica, sendo assim, essa parte do trabalho traz uma avaliação sistemática da etapa de pré-processamento dos dados eletroforéticos.

Os eletroferogramas foram transportados para a plataforma MATLAB para serem quimiometricamente tratados. Os 32 eletroferogramas foram agrupados em uma matriz 32 x 3000. Isso significa 32 amostras arranjadas nas linhas e cada uma das 3000 variáveis dispostas em colunas, estas últimas que se referem às respostas instrumentais referentes a cada tempo de migração. Todos eletroferogramas foram alinhados pelo uso da ferramenta *icoshift* (TOMASI; SAVORANI; ENGELSEN, 2011), onde o conjunto de dados foi dividido em 50 intervalos, seguido por uma reconstrução do sinal por uma ferramenta interna do algoritmo. Após o alinhamento, os pré-processamentos testados foram: centragem na média (GEMPERLINE, 2006), autoescalamento (MONAKHOVA; TSIKIN; MUSHTAKOVA, 2016), filtro derivativo Savitsky-Golay (SG) (SAVITZKY; GOLAY, 1964a), escalonamento por pareto (MONAKHOVA; TSIKIN; MUSHTAKOVA, 2016; VAN DEN BERG et al., 2006) e a transformação SNV (BARNES; DHANOA; LISTER, 1989). Por fim, a seleção de variáveis com base no conhecimento do analista foi feita. A modelagem por PCA foi realizada utilizando todas as variáveis dos eletroferogramas e também utilizando regiões selecionadas contendo as informações do analitos.

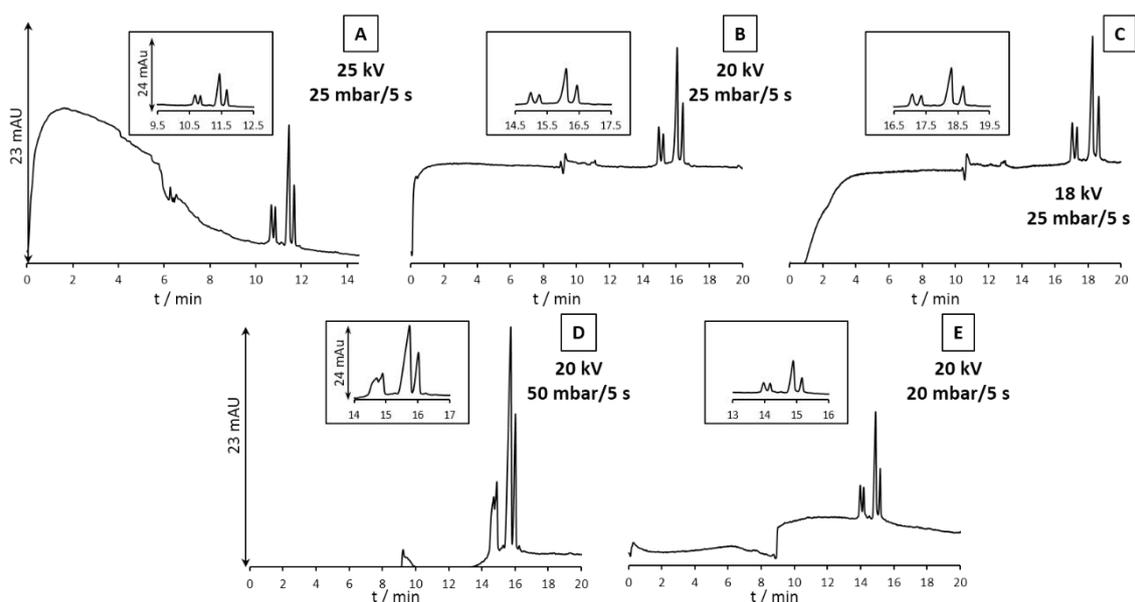
4.1.2 Resultados e discussões

4.1.2.1 Otimização das condições eletroforéticas

Parâmetros como temperatura e frequência de aquisição para construção do sinal eletroforético não apresentaram significativa influência nos sinais eletroforéticos nem no perfil de separação dos analitos, sendo esses diretamente definidos em 25 °C e 2,5 Hz, respectivamente. A injeção de amostra no modo eletrocínético não apresentou uma boa resposta, fazendo com que o modo de injeção hidrodinâmico fosse o mais

adequado. Já o valor da pressão aplicada no modo hidrodinâmico e a voltagem se mostraram como variáveis significativas e foram avaliadas conforme mostrado na Tabela 3; os resultados referentes a esses testes são apresentados na Figura 2.

Figura 2: Eletroferogramas do extrato hidrometanólico (MeOH/H₂O 80:20 v/v) para avaliar as modificações de voltagem e pressão de injeção no modo hidrodinâmico conforme descrito na Tabela 3. A correlação entre a Figura 2 e a Tabela 3 é dada por: teste 1 (A), 2 (B), 3 (C), 4(D) e 6(E). O teste 5 refere-se ao mesmo gráfico B pois foi realizado com +20 kV de voltagem e pressão de injeção 25 mbar/5 s. O eletrólito foi composto de carbonato de amônio a 160 mmol L⁻¹ em pH 9 e os analitos foram monitorados em 230 nm



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os eletroferogramas A, B e C da Figura 2 dizem respeito aos testes 1, 2 e 3 da Tabela 3, onde foi avaliado o efeito da voltagem na separação dos α -ácidos e os eletroferogramas D, B e E aos testes 4, 5 e 6 da mesma tabela, onde a variável pressão de injeção foi avaliada. Um ponto comum a todos esses testes foi a separação entre α e β -ácidos que será discutida mais adiante. No que diz respeito ao parâmetro voltagem, observa-se nos eletroferogramas A, B e C que com a diminuição da voltagem aplicada, um significativo aumento no tempo de migração dos analitos foi observado, como esperado teoricamente.

Uma vez que os outros parâmetros foram mantidos constantes e variado apenas a voltagem, chegou-se à conclusão que trabalhar com +20 kV de voltagem era o mais adequado, visto que o eletroferograma B apresentou uma melhor linha de base e boa separação entre os picos em um tempo de análise que se teria uma boa frequência analítica. Quando avaliado o parâmetro pressão de injeção (eletroferogramas D, B e E), mantendo os outros parâmetros fixos, percebe-se que o gráfico B (25 mbar/5 s) refere-se ao melhor eletroferograma, visto que os picos estão mais separados do que no eletroferograma D (50 mbar/5 s), onde é visto uma comigração dos β -ácidos. Além disso um maior sinal analítico é obtido quando comparado com os picos obtidos no eletroferograma E (20 mbar/5 s), onde foram obtidos picos com menores intensidades e áreas.

Sendo assim, o método otimizado consistiu na utilização de 160 mmol L⁻¹ de carbonato de amônio (pH 9) como BGE, sendo aplicada voltagem positiva de 20 kV a um capilar de 62,5 cm de comprimento total (54 cm de comprimento efetivo), disposto em um cartucho com temperatura constante e igual a 25 °C. As amostras foram injetadas no sistema de CE no modo hidrodinâmico aplicando pressão de 25 mbar por 5 s. Entre as corridas o capilar foi lavado e equilibrado aplicando *flush* de hidróxido de sódio 0,2 mol L⁻¹, seguido de água e eletrólito por 120 s cada um deles. A frequência de aquisição de pontos foi de 2,5 Hz e os analitos foram detectados em 230 nm.

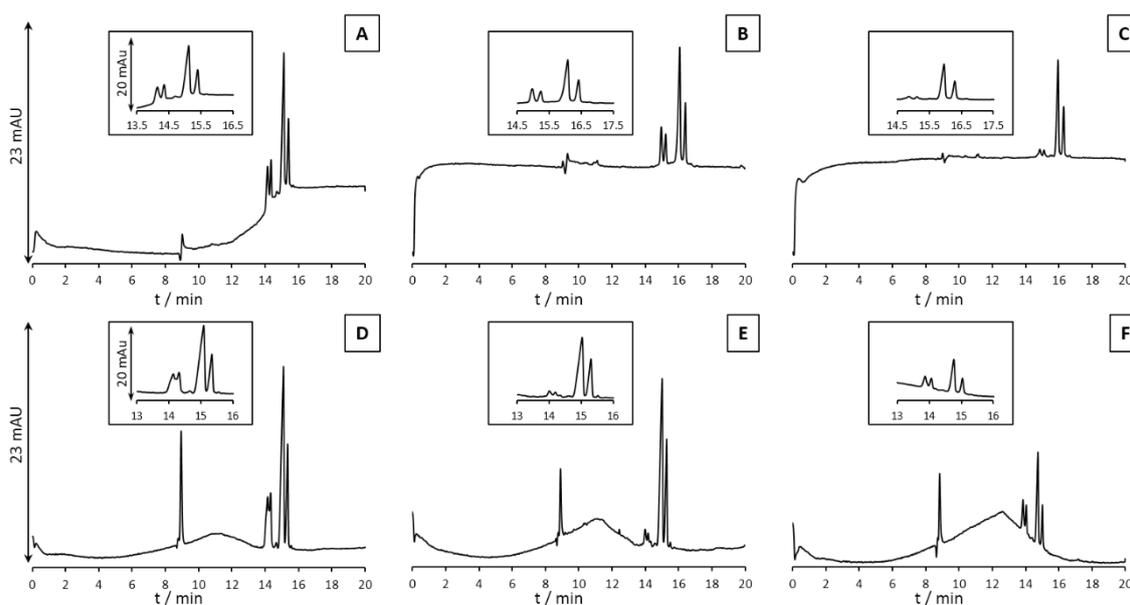
4.1.2.2 Otimização da extração

A extração dos α -ácidos foi outra importante etapa otimizada nesse trabalho, conforme descrito na subsubseção 4.1.1.3, sendo os testes descritos na Tabela 4. Os resultados dos testes são mostrados na Figura 3. Em todos testes foram aplicados os mesmos parâmetros eletroforéticos pré-definidos na subseção anterior.

Nos eletroferogramas A, B e C (Figura 3) são mostrados os resultados das extrações metanólicas e hidrometanólicas e nos gráficos D, E e F (Figura 3) das extrações com acetona/água em diferentes tempos. Comparando todos eletroferogramas, os resultados dos extratos empregando metanol apresentaram melhores resultados do que empregando acetona, tomando como parâmetro de avaliação a linha base e o perfil de separação. Por exemplo, ao analisar o eletroferograma D, cuja extração ocorre com Acetona/H₂O 75:25 v/v por 180 min, nota-se que os β -ácidos não foram separados

como ocorre no eletroferograma B, onde foi usado MeOH/H₂O 80:20 v/v como solução extratora. Comparando os gráficos B e C, nota-se que ao aumentar o percentual de água de 20% para 50% (eletroferograma C) em volume, uma diminuição do sinal analítico para os α -ácidos é observada, além dos β -ácidos serem mais dificilmente extraídos. Já o eletroferograma A, onde é usado 100% de metanol para a extração, o perfil de separação na região de interesse é mais semelhante ao do eletroferograma B, porém tendo os picos referentes aos β -ácidos com menor resolução, além de apresentarem picos menos simétricos e com linha base mais variável.

Figura 3: Eletroferogramas das extrações descritas na Tabela 4. A correlação entre a Figura 3 e a Tabela 4 é: gráfico A (Ext1), B (Ext2), C(Ext3), D(Ext4), E(Ext5) e E(Ext6). Método eletroforético: BGE – 160 mmol L⁻¹ de carbonato de amônio (pH 9); voltagem de +20 kV; injeção: modo hidrodinâmico 25 mbar/5 s; temperatura do cartucho de 25 °C; capilar de 62,5 cm de comprimento total (54 cm de comprimento efetivo – 50 μ m i.d.), detecção em 230 nm (2,5 Hz)

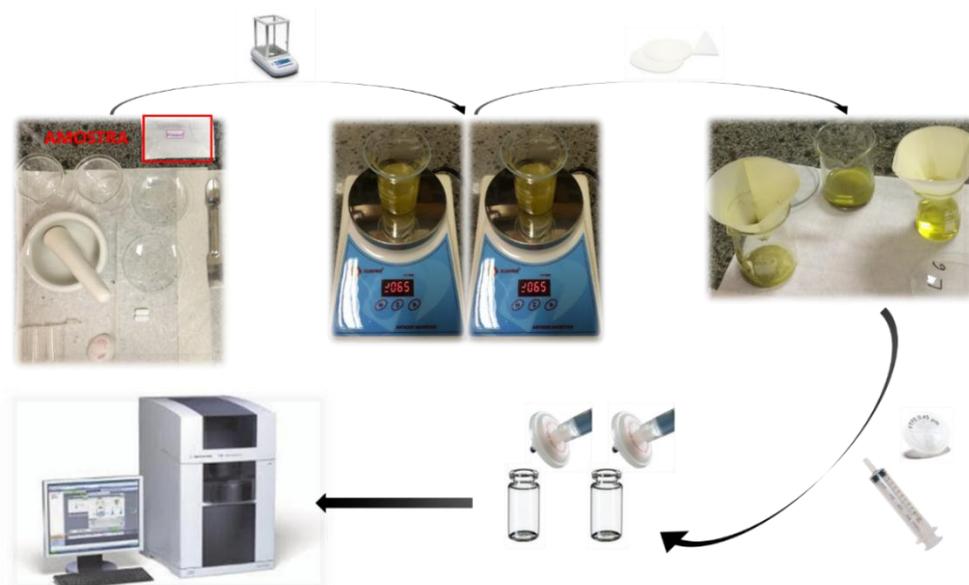


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Dessa forma, o método de extração considerado como mais adequado tem seu resultado apresentado pelo eletroferograma B da Figura 3, referente a EXT2 da Tabela 4. O método consistiu na pulverização dos pellets com auxílio de almofariz e pistilo, seguido da pesagem de cerca de 300 mg de amostra em um béquer e adição de 30,0 mL da solução extratora, sendo a mistura MeOH/H₂O 80:20 (v/v) a que trouxe melhores

resultados. A essa mistura foi adicionada uma barra magnética, o béquer foi fechado utilizando um vidro de relógio e a extração ocorreu sob contínua agitação a 650 rpm utilizando um agitador magnético à temperatura ambiente. Ao término das 3 h, o extrato foi inicialmente filtrado em filtro de papel (80 g) para retirada do excesso de material vegetal e em seguida em filtro de 0,45 μm utilizando uma seringa de plástico. Cerca de 500 μL do extrato filtrado foi transferido para o vial para posterior injeção no sistema de CE e o volume restante foi estocado em frasco âmbar a uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Um esquema é mostrado na Figura 4.

Figura 4: Esquema do método de extração adotado no trabalho



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O eletroferograma levando em consideração os métodos eletroforético e de extração otimizados pode ser visto de forma ampliada no esquema da Figura 5. É possível discutir a ordem de migração dos analitos com base na literatura (KORNYSOVA et al., 2009) e também realizando uma análise baseada nas estruturas moleculares das duas classes de compostos. Os β -ácidos migram com maior velocidade do que os α -ácidos e, portanto são detectados primeiro devido ao seu maior raio de solvatação, uma vez que seu volume molar é maior por ter a hidroxila do carbono 6 do anel substituída por um radical 2-metilbut-2-eno quando comparado com os α -ácidos. Isso faz com que os β -ácidos possuam menor mobilidade eletroforética (μ_{ep}) e, por se

muito próximos dificultando a separação. As formas co- para lupulonas e humulonas podem ser identificadas como sendo referente ao segundo pico de cada classe no eletroferograma, pois por possuírem um carbono a menos no grupamento R são mais facilmente separadas e migram após as formas n- e ad-, uma vez que possuem menor raio de solvatação e por conseguinte maiores μ_{ep} , o que leva a resistir mais ao fluxo eletrosmótico. Os compostos isômeros constitucionais de posição n- e ad- para lupulonas ou humulonas possuem grupamento R com cinco carbonos, sendo radicais isobutil e sec-butil respectivamente, enquanto que os compostos co- para lupulonas e humulonas possuem no grupamento R um radical de isopropil. Essa discussão também pode ser entendida quando avaliada pelo esquema de separação mostrado na Figura 5.

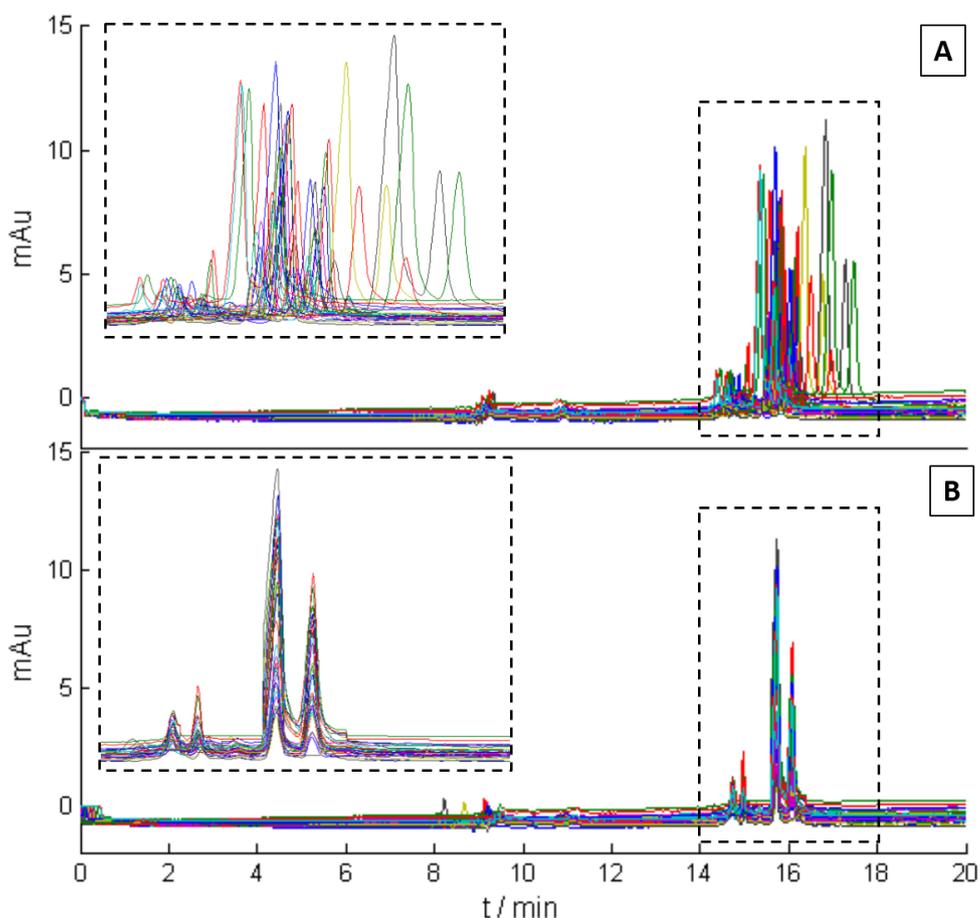
4.1.2.3 Classificação dos lúpulos

Definido o método eletroforético e o método de extração, a análise das 32 amostras foi realizada de acordo com as otimizações. À partir do perfis eletroforéticos obtidos, foi feita a modelagem quimiométrica com intuito de classificação das amostras de lúpulos.

Com a finalidade de utilizar os eletroferogramas como dados de entrada para a realização da PCA, o primeiro passo foi o alinhamento dos eletroferogramas. Na Figura 6A é mostrado o agrupamento dos 32 eletroferogramas referentes as amostras. Uma expansão da região de 14 a 18 minutos evidencia o desalinhamento dos picos. A ferramenta usada para a realização do alinhamento foi a *icoshift*. Na Figura 6B é mostrado o agrupamento dos 32 eletroferogramas após o alinhamento com uma expansão na região de 14 a 18 minutos para evidenciar o efeito dos picos alinhados.

Com os eletroferogramas alinhados, foi feita uma outra etapa de avaliação dos sinais utilizados como dados de entrada para a modelagem. Para tanto, testes de pré-processamento foram realizados para correção de sinais indesejados na informação analítica, permitindo que fossem utilizadas somente as informações mais relevantes dos eletroferogramas.

Figura 6: Eletroferogramas das 32 amostras sem alinhamento (A) e após alinhamento utilizando a ferramenta icoshift (B). Para ambos os gráficos uma expansão na região entre 14 e 18 minutos evidencia o desalinhamento e alinhamento dos picos, respectivamente

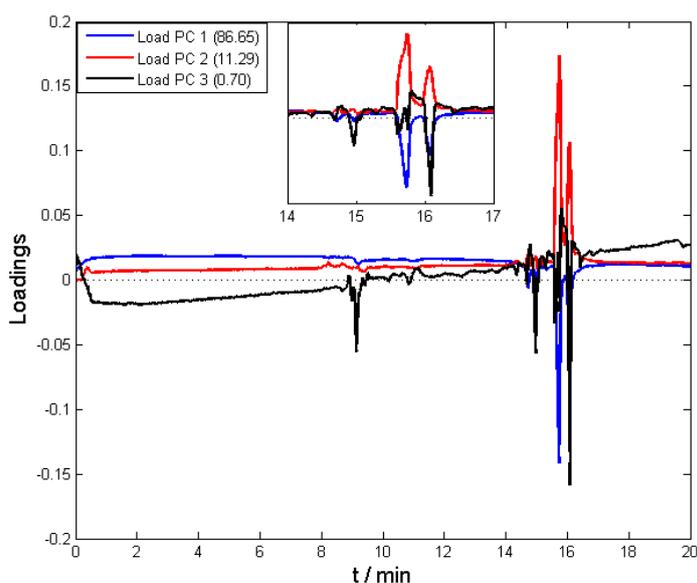


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O efeito da redução de variáveis na matriz de dados visando avaliar a performance da modelagem foi estudado. A seleção de variáveis foi realizada com base no conhecimento da resposta disponível no eletroferograma de acordo com a região dos picos referentes aos analitos. Uma das formas de realizar a redução de variáveis é através do conhecimento da região de interesse no eletroferograma, no entanto, existem outras formas de buscar uma região mais estreita e adequada para ser usada como dados de modelagem. Inicialmente, buscou-se encontrar variáveis importantes realizando uma PCA considerando todo eletroferograma e, então, avaliar o gráfico de loadings com o objetivo de encontrar as regiões de maior peso indicadas por cada PC.

Na Figura 7 é mostrado que a PC1 e PC2, componentes com praticamente toda explicação das variáveis originais, dão maior relevância a região dos α e β -ácidos, apontando que uma redução de variáveis que trabalhe somente nessa região poderia ser mais vantajosa do que utilizar o eletroferograma inteiro. Por outro lado, as informações fornecidas pela PC3 não foram levadas em consideração, pois além de apresentar um baixo percentual de variância explicada, essa PC dá grande peso a região referente ao pico do fluxo eletrosmótico, em 9,13 min, sendo este sinal irrelevante para o propósito da investigação. Ademais, a PC3 também dá elevado peso a região dos β -ácidos, estes que não são efetivamente responsáveis para o cálculo do % α -A, além de apresentar um perfil ruidoso e mais discrepante do eletroferograma das amostras.

Figura 7: Gráfico de loadings da PCA realizada com todo eletroferograma alinhado conforme resultado disponível na Figura 9 A

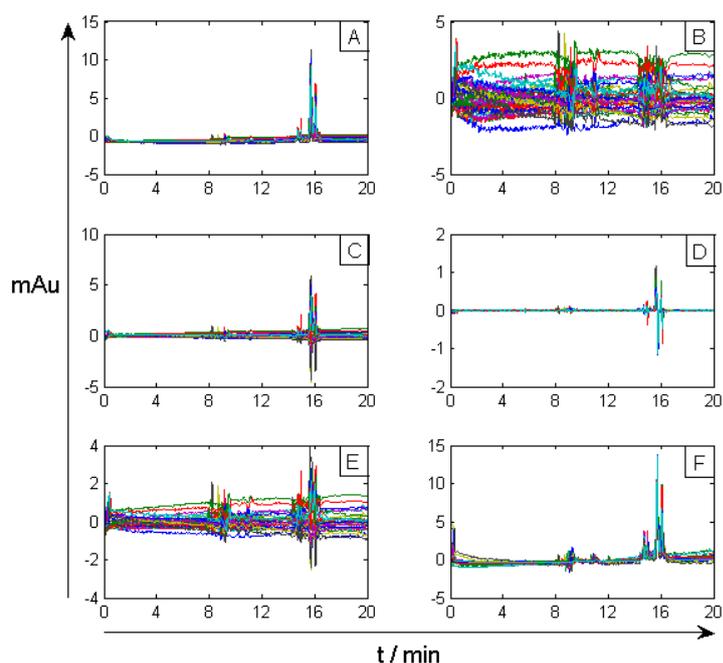


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Então foram feitas as modelagens por PCA dos diferentes testes propostos, trabalhando com o eletroferograma global ou pelos cortes em regiões específicas dos eletroferogramas. Além disso, os diferentes testes de pré-processamento foram avaliados para todas as regiões a fim de obter uma classificação das amostras que fosse coerente com a natureza química da planta e com as informações fornecidas pelo fabricante. O efeito visual dos eletroferogramas após a realização dos diferentes pré-processamentos testados nesse trabalho é mostrado na Figura 8. Os resultados das

modelagens feitas por PCA são mostrados nas Figuras 9 e 10 e uma tabela completa contendo os percentuais de variância explicada para as três primeiras PCs de cada teste é mostrada na Tabela 5.

Figura 8: Efeito do pré-processamento nos 32 eletroferogramas das amostras de lúpulo quando aplicado: autoescalamento (B), centragem na média (C), filtro derivativo SG (D), escalonamento por pareto (E) e transformação SNV (F). O gráfico A mostra os eletroferogramas apenas alinhados.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Analisando os resultados disponíveis nos gráficos das Figuras 9 e 10 em concomitância com as informações de % α -A da Tabela 2, em linhas gerais, com exceção dos resultados pré-processados com SNV que não apresentaram algum tipo de padrão, algumas características comuns aos demais testes foram observadas, sendo elas: i) a separação em dois principais conjuntos, sendo um com amostras de mais baixo % α -A (destacado com linha azul) e outro com amostras de mais alto % α -A (destacado com linha vermelha); ii) o conjunto de mais baixo % α -A ficou mais agrupado, enquanto que o de mais alto % α -A ficou mais disperso; iii) as amostras 15 e 16 com % α -A igual a 7,1 (valor intermediário), se localizaram entre os dois grupos; iv) as réplicas ficaram próximas indicando que as etapas de extração e análise por CZE foram precisas; v) em

todas análises de PCA foram avaliadas 3 PCs e a variância explicada foi sempre superior a 90% (Tabela 5).

Tabela 5: Variância explicada para todas as PCAs considerando os pré-processamentos avaliados.

	Região do eletroferograma	PC1 %	PC2 %	PC3 %	Total %
Somente alinhado	Global	86,65	11,29	0,70	98,64
	$\alpha + \beta$ -ácidos	92,20	5,22	1,21	98,63
	α -ácidos	94,54	3,74	0,84	99,12
Autoescalonado	Global	79,60	9,54	3,76	92,90
	$\alpha + \beta$ -ácidos	72,18	10,51	7,89	90,58
	α -ácidos	81,62	10,48	3,99	96,09
Centrado na média	Global	75,53	15,83	3,41	94,77
	$\alpha + \beta$ -ácidos	90,43	4,32	2,49	97,24
	α -ácidos	92,96	3,83	1,51	98,30
Filtro derivativo SG	Global	90,82	3,90	1,77	96,49
	$\alpha + \beta$ -ácidos	91,77	3,88	1,66	97,31
	α -ácidos	92,84	3,77	1,43	98,04
Pareto	Global	67,07	18,95	4,76	90,78
	$\alpha + \beta$ -ácidos	76,91	10,69	6,20	93,80
	α -ácidos	85,97	8,26	2,98	97,21
SNV	Global	89,60	4,43	2,83	96,86
	$\alpha + \beta$ -ácidos	93,69	3,10	1,59	98,38
	α -ácidos	95,25	2,52	1,26	99,03

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 9: Análise de componentes principais dos eletroferogramas de dezesseis tipos de extratos hidrometanólicos de lúpulo em duplicata usando toda informação eletroforética (A, B e C), a região dos picos de α e β -ácidos (D, E e F) e somente a região dos picos dos α -ácidos (G, H e I). Também foram levados em consideração a PCA com dados sem pré-processamento (A, D e G), autoescalando (B, E e H) e centrando na média (C, F e I).

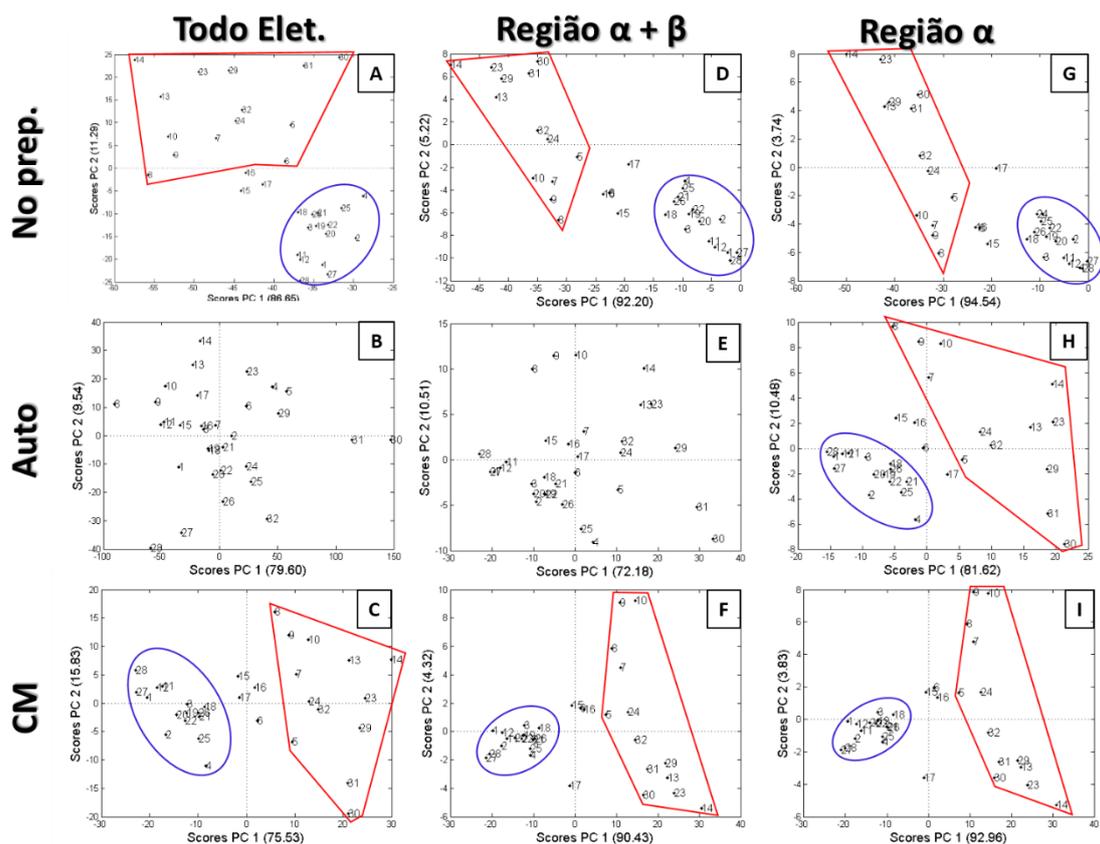
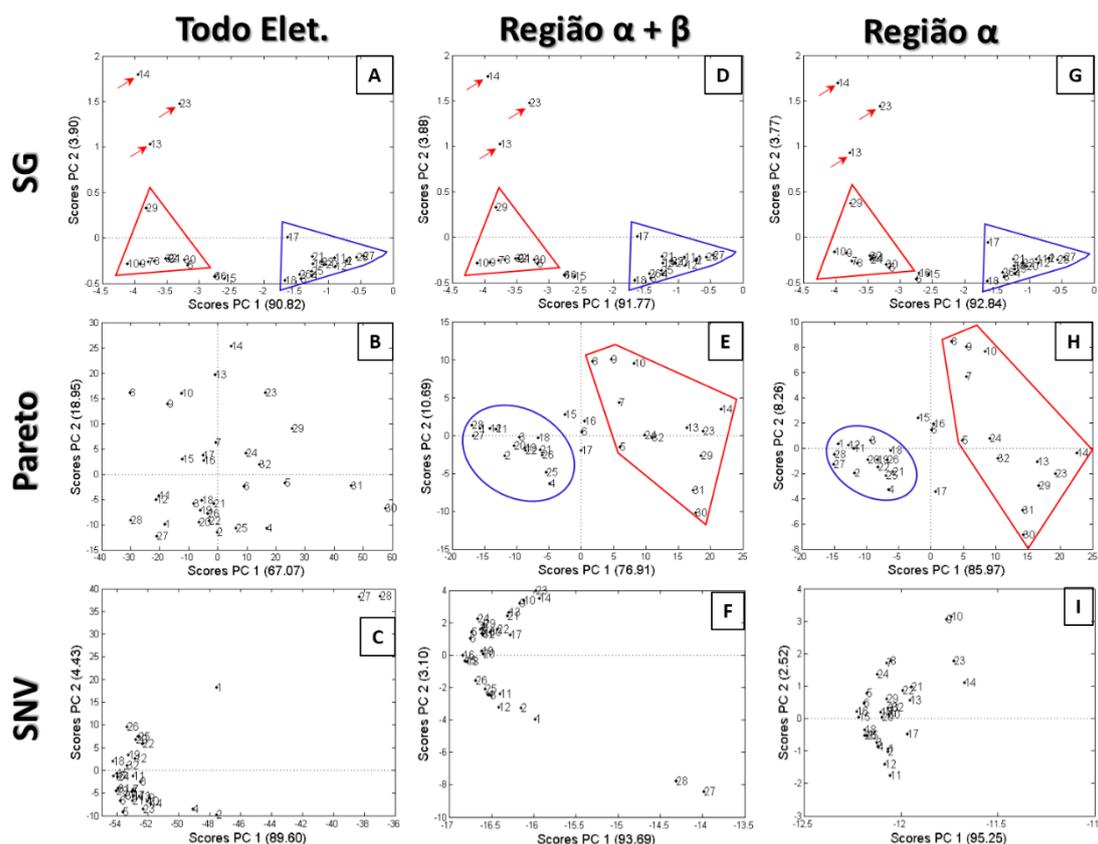


Figura 10: Análise de componentes principais dos eletroferogramas de dezesseis tipos de extratos hidrometanólicos de lúpulo em duplicata usando toda informação eletroforética (A, B e C), a região dos picos de α e β -ácidos (D, E e F) e somente a região dos picos dos α -ácidos (G, H e I). Também foram levados em consideração a PCA com dados aplicando filtro derivativo SG (A, D e G), aplicando pareto (B, E e H) e aplicando SNV (C, F e I)



Olhando as três colunas de gráficos das Figuras 9 e 10 pode-se perceber o efeito da redução de variáveis na construção dos modelos de classificação, considerando tanto os eletroferogramas somente alinhados (A, D e G da Figura 9) quanto os pré-processados. Da esquerda para direita temos os resultados onde foram usados todo eletroferograma totalizando 3000 variáveis (primeira coluna de gráficos), a região contemplando as informações de α e β -ácidos com 286 variáveis (segunda coluna de gráficos) e somente de α -ácidos com 151 variáveis (terceira coluna de gráficos). Um ponto comum à redução das variáveis foi o aumento da variância explicada pela PC1 indicando que as variáveis na região de interesse apresentam maiores correlações. Uma exceção ocorreu quando os eletroferogramas foram autoescalonados, pois com a redução das variáveis para a região de α + β -ácidos houve uma diminuição na variância

explicada da PC1 de 79,60% para 72,18%. Outro ponto comum à redução das variáveis, exceto para os dados pré-processados com filtro derivativo SG, em que as três abordagens apresentam resultados similares, foi a observação de uma melhor classificação e maior agrupamento das amostras. Isso ocorreu quando deixou-se de trabalhar com todo eletroferograma e passou-se a trabalhar na região contendo a informação de interesse, visto que na análise com o eletroferograma global (primeira coluna de gráficos) as amostras estão mais dispersas, enquanto que ao realizar a primeira redução (segunda coluna de gráficos) é mais perceptível a separação em dois grupos, um mais agrupado apresentando amostras com menores valores de % α -A (destacado em azul) e outro mais disperso apresentando amostras com valores mais elevados de % α -A (destacado em vermelho). Quando passou-se a trabalhar somente na região dos α -ácidos, houve uma redução de 286 para 151 variáveis, quando comparada com a modelagem realizada na região de α e β -ácidos, porém não observou-se diferença significativa no padrão classificação da análise por PCA, o que permite inferir que a região dos β -ácidos tem pouca importância para esse tipo de classificação.

Considerando os outros pré-processamentos, o primeiro ponto a ser destacado é que os eletroferogramas pré-processados com SNV (Figura 10, gráficos de scores C, F e I) não favoreceram a classificação, tanto com ou sem seleção de variáveis. O SNV é amplamente utilizado para aplicações diretas em espectroscopia, especialmente em infravermelho próximo (NIR, sigla do inglês para *near infrared*), visto que ele tem o poder de corrigir variações na linha de base originadas principalmente por efeitos de espalhamento e diferença em tamanho de partícula, sendo também utilizado para problemas de multicolinearidades (BARNES; DHANOA; LISTER, 1989). No entanto, para essa aplicação em eletroforese melhores resultados foram atingidos com outros pré-processamentos. O efeito dos outros pré-processamentos, usando o modelo global ou com seleção de variáveis, pode ser observado nas demais linhas de gráficos das Figuras 9 e 10.

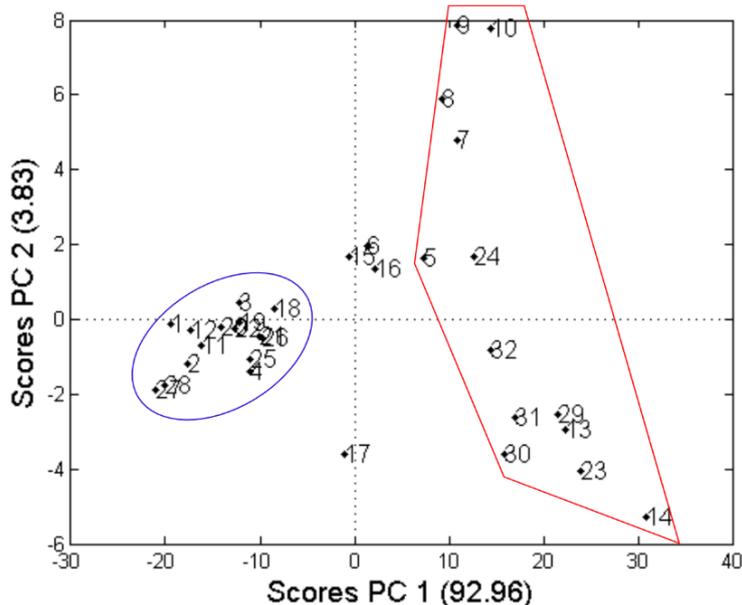
Dentre os métodos de escalonamento, os dados pré-processados com pareto (Figura 10, gráficos de scores B, E e H) levaram a melhores resultados quando comparado com a aplicação do autoescalamento (Figura 9, gráficos de scores B, E e H). Para ambos os casos, usando os modelos globais, não foi possível observar uma separação entre os dois grupos de lúpulos, mas quando a seleção de variáveis foi feita foi possível observar uma melhor classificação, principalmente quando somente a

região de α -ácidos foi considerada. Comparando os dois métodos, pareto apresentou melhores resultados, fornecendo maiores percentuais de variância explicada em suas PCs, sendo 97,21% contra 96,09% na abordagem com autoescalonamento. Outro ponto é que uma melhor separação entre os dois grupos de lúpulo foi observada aplicando pareto. Além disso, comparando o perfil dos eletroferogramas após a aplicação dos pré-processamentos, com pareto (Figura 8 E) o perfil eletroforético é menos desconstruído do que quando aplicado o autoescalonamento (Figura 8 B). Pré-processando com o filtro derivativo SG, inicialmente avaliando o perfil eletroforético após a aplicação do filtro (Figura 8 D), é possível notar um efeito de maior suavização da linha base com diminuição dos ruídos para o conjunto de eletroferogramas, além de poder evidenciar a região contendo a informação analítica, o que implica em um significativo aumento da razão sinal ruído. Os resultados da modelagem por PCA são mostrados na Figura 10 (gráficos de scores A, D e G). Pode ser visto que não há diferença significativa entre a modelagem com ou sem redução de variáveis, mostrando que o efeito do filtro derivativo suprime a informação irrelevante quando todo eletroferograma é utilizado, dando ênfase somente a região de interesse. Para esses três modelos o perfil de separação dos grupos é o mesmo, apresentando boa discriminação na PC1 entre os grupos com mais baixos e mais elevados valores de % α -A, visto que mais de 90% da variância é explicada considerando as três abordagens. As PCAs com o filtro SG mostram as amostras com baixo % α -A (linha azul) altamente agrupadas como em alguns outros pré-processamento, mas diferentemente das outras abordagens, o grupo de amostras com valores mais elevados de % α -A (linha vermelha) aparecem menos dispersos. No entanto, quando as amostras com alto % α -A são avaliadas, a amostra 29 é ligeiramente separada do conjunto principal e as amostras 13, 14 e 23 são ainda mais dispersas, como um resultado do efeito da PC2 na modelagem. Outro importante ponto que evidencia o poder do filtro SG nos dados, mesmo utilizando todo o eletroferograma, foi a variância explicada para as 3 PCs serem muito próximas considerando as três abordagens, sendo os percentuais iguais a 96,49%, 97,31% e 98,04% quando modelado com todas as variáveis (todo eletroferograma), usando a região de $\alpha + \beta$ -ácidos e somente a região dos α -ácidos, respectivamente.

A modelagem com os dados centrados na média é mostrada na Figura 9 (gráficos de scores C, F e I) e o efeito visual desse pré-processamento na Figura 8 C, onde é possível perceber que não há distorções significativas no perfil eletroforético

quando comparado com os eletroferogramas somente alinhados (Figura 8 A). Essa simples transformação matemática foi atribuída como o melhor pré-processamento para os dados eletroforéticos do lúpulo, devido a sua simplicidade e por promover uma boa separação entre os grupos de lúpulos com baixo e elevado valor de % α -A. Esses resultados foram significativos para utilização de todo eletroferogramas e, principalmente, quando trabalhado somente com a região que continha os picos dos α -ácidos. Esta última abordagem que apresentou melhoras significativas na separação dos grupos (Figura 9 I) e também no percentual de explicação das variáveis originais. Portanto, o resultado da PCA usando os dados alinhados, centrados na média e trabalhando somente com as variáveis da região dos α -ácidos foi tido como o mais adequado. O gráfico de scores referente a essa abordagem é ampliado e mostrado na Figura 11 para uma discussão mais detalhada das amostras.

Figura 11: Análise de componentes principais dos eletroferogramas alinhados e centrados na média de dezesseis tipos de extratos hidrometanólicos de lúpulo em duplicata usando a região dos picos dos α -ácidos



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Avaliando a Figura 11, inicialmente percebe-se que a PC1 com 92,96% de explicação permite a separação entre os grupos lúpulo com baixo % α -A (linha azul) e com alto % α -A (linha vermelha). Algumas amostras com valor intermediário de % α -A aparecem mais ao centro, como é o caso das amostras 15 e 16 (7,1 de % α -A). O grupo

mais compacto (linha azul), com baixos valores de scores na PC1, é o grupo com mais baixo % α -A, onde as amostras 1 e 2, 3 e 4, 11 e 12, 19 e 20, 25 e 26 e 27 e 28 apresentam os valores de 2,2, 5,0, 3,0, 3,8, 5,2 e 2,5 respectivamente para o % α -A. Já o grupo mais disperso à direita (linha vermelha) apresenta valores mais altos de % α -A, onde as amostras 5 e 6, 7 e 8, 9 e 10, 13 e 14, 23 e 24, 29 e 30 e 31 e 32 apresentam os valores 10,5, 15,3, 12,6, 12,6, 8,8, 12,1 e 12,1, respectivamente, para o % α -A. É importante destacar que a maior dispersão no conjunto de amostras com mais alto % α -A é um resultado da contribuição da PC2. Algumas amostras apresentaram-se com leves desvios de posição de acordo com a lógica apontada pelo método classificatório e pela comparação de posição com sua réplica. Esse é o caso da amostra de número 17 com 5,7 % α -A, essa que não apareceria tão ao centro da PC1 como as amostras 15 e 16. Caso semelhante ocorre com a amostra de número 6, mas para o lado positivo dos scores da PC1. Por outro lado, nessa análise temos uma amostra que pode ser dita como um *outlier*, pois suas réplicas de número 21 e 22 com valor de 10,8 de % α -A, aparecem na região que o modelo tem apontado como sendo de baixos valores de % α -A. À essa disparidade pode-se tentar atribuir erros do analista durante a etapa de processamento inicial dos dados, erro de codificação da amostra ou ainda erro na informação do fabricante.

4.1.3 Conclusão

Essa parte do trabalho mostrou o estudo e otimização de alguns parâmetros para identificação de α -ácidos no lúpulo, bem como a classificação de lúpulos de amargor e aroma a partir de seus perfis eletroforéticos com o auxílio de ferramentas quimiométricas. Com relação aos aspectos mais práticos, esse trabalho traz duas principais contribuições. A primeira, de interesse para a indústria de alimentos, cervejeira e para pesquisadores na área de produtos naturais e de plantas, pois uma abordagem foi proposta para a classificação de amostras de lúpulo de diferentes variedades com baixo e elevado % α -A à partir de uma extração hidrometanólica simples sem ser necessário o uso de padrões analíticos de elevado custo. Em segundo lugar, foi proposto o desenvolvimento de uma cuidadosa sequência de passos para o uso da informação eletroforética como dados de entrada para modelagem multivariada. Para isso, a sequência de etapas proposta envolve a avaliação e otimização da: i) etapa experimental para aquisição de uma informação eletroforética de alta qualidade

analítica; ii) etapa de avaliação dos métodos de pré-processamentos, onde é necessário investigar a necessidade do alinhamento, da correção de linha base e eliminação de artefatos, e da seleção de variáveis levando em consideração a experiência do analista ou utilizando algum algoritmo específico; iii) a etapa de modelagem propriamente dita. É importante ressaltar que esse protocolo pode ser útil para aplicações em vários tipos de trabalhos envolvendo eletroforese.

4.2 SEPARAÇÃO EM LINHA DE BASE DOS HOMÓLOGOS E ISÔMEROS DAS HUMULONAS E LUPULONAS EM LÚPULO POR CD-MEKC-UV

Considerando a relevância dos α e β -ácidos (humulonas e lupulonas respectivamente), o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes para identificação ou determinação desses analitos tem sido um grande desafio. Nesse sentido, existem disponíveis na literatura métodos que permitem discriminar α e β -ácidos. A técnica mais amplamente empregada para esse propósito é a HPLC (CULIK et al., 2009; HOFTE; HOEVEN, 1998; PUSECKER; ALBERT; BAYER, 1999; ROJ et al., 2015; VERZELE; DYCK; CLAUS, 1980b). No entanto, a separação total dos seis principais homólogos e isômeros dos α e β -ácidos não é uma tarefa simples e dos métodos disponíveis na literatura, poucos conseguem uma separação em linha de base para esses compostos. Além disso, os métodos onde todos os seis homólogos e isômeros foram separados, longos tempos de análise foram reportados. Ceslová et al. (2009) e Kao *et al.* (2013) alcançaram a separação completa desses compostos usando a HPLC com tempos de análise de 32 e 28 minutos, respectivamente.

Outra importante técnica para análise de lúpulo com intuito de separar os α e β -ácidos é a CE (CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2003). Dentro dos diferentes modos de CE, alguns trabalhos envolvendo CZE (ARRÁEZ-ROMÁN et al., 2006; DUARTE; ADRIANO; DE OLIVEIRA, 2018; KORNYSOVA et al., 2009; VILLALBA et al., 2006), Eletrocromatografia Capilar (sigla do inglês, CEC) (VANHOENACKER et al., 2001) e a MEKC (FORMATO et al., 2013; ROYLE et al., 2001; VINDEVOGEL; SANDRA; VERHAGEN, 1990) foram encontrados para determinação de α e β -ácidos em amostras de lúpulo. A separação dos seis compostos por CE não é um simples desafio. Utilizando CZE, alguns trabalhos mostraram eletroferogramas contendo quatro picos para as seis humulonas e lupulonas, ou seja,

duas comigrações ocorreram sendo uma entre os isômeros de posição n- e adhumulona e outra entre os também isômeros de posição n- e adlupulona.

Para a completa separação dos seis compostos, foi utilizado MEKC contendo o surfactante dodecil sulfato de sódio (SDS) como constituinte do BGE. O SDS ao atingir a concentração micelar crítica resulta na formação de micelas, essas que funcionarão como fases pseudo-estacionárias (DEEB; IRIBAN; GUST, 2011). Dentre os métodos disponíveis por MEKC, Vindevogel et al. (1990) reportaram a separação total dos seis compostos com um tempo de análise de 30 minutos; Royle et al. (2001) puderam identificar cinco compostos em uma corrida eletroforética de 30 minutos, sendo a identificação dos isômeros n- e adhumulona não conclusiva e Formato et al. (2013) também trabalharam com MEKC, mas sem conseguir separar os três α -ácidos.

Um outro modo de CE é a MEKC modificada com ciclodextrina (sigla do inglês, CD-MEKC), este que foi introduzido por Terabe no início dos anos 1990, com o objetivo principal de aumentar o poder de separação de compostos hidrofóbicos e enantioméricos quando comparado com a MEKC convencional (TERABE et al., 1990). Nesse modo de CE, além das micelas, a CD é adicionada ao BGE e os analitos, inicialmente dispostos no meio tamponado, vão interagir de forma diferenciada com os dois seletores, sendo eles a micela e a CD (TERABE et al., 1993).

Nessa parte do trabalho, é proposto o desenvolvimento de um método rápido e eficiente que permite alcançar a separação em linha de base para todos os isômeros e homólogos dos α e β -ácidos. Dentro do nosso conhecimento, essa é a primeira vez que esse modo de CE é utilizado para esse propósito. De posse do método otimizado, o mesmo foi aplicado para análise de vinte e uma diferentes variedades de lúpulo.

4.2.1 Parte experimental

4.2.1.1 Reagentes soluções e amostras

Os reagentes foram obtidos em grau analítico e a água utilizada foi purificada empregando o sistema de osmose reversa (Milli-Q; Milipore, Bedford, MA, EUA). Tetraborato de Sódio (TB), SDS, acetonitrila (ACN), metanol (MeOH) e hidróxido de sódio (NaOH) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). β -CD foi comprada da Sigma-Aldrich. (St. Louis, MO, EUA). Soluções aquosas estoques de 150 mmol L⁻¹ TB e 120 mmol L⁻¹ SDS foram preparadas usando água deionizada. O

BGE foi preparado diariamente em um balão volumétrico de 2,0 mL, ao qual foram adicionados sequencialmente 0,0454 g de β -CD (20 mmol L^{-1}), seguido de alíquotas tomadas dos respectivos estoques de 0,4 mL de TB (30 mmol L^{-1}) e 0,75 mL de SDS (45 mmol L^{-1}) e, por fim, 0,2 mL de ACN (10% v/v). Os lúpulos comerciais de diferentes variedades foram fornecidos pela empresa Muller Empório de Malte, localizada na cidade de Juiz de Fora, MG. Apesar da maioria das amostras utilizadas nessa parte do trabalho serem da mesma variedade das plantas utilizadas no trabalho anterior, mostradas na Tabela 2, essas são de novos lotes visto que a estocagem por longos períodos de amostras já abertas pode levar à formação de subprodutos; os compostos estudados são fotossensíveis e passíveis de oxidação. Além disso, novas amostras foram estudadas quando comparadas com o trabalho anterior, como é o caso dos lúpulos Cascade e Mosaic, entre outras.

4.2.1.2 *Extração*

O procedimento de extração foi o mesmo otimizado no trabalho anterior (DUARTE; ADRIANO; DE OLIVEIRA, 2018). Aproximadamente 300,0 mg de lúpulo pulverizado foi submetido a extração sólido-líquido empregando 30,0 mL de MeOH/H₂O 80:20 v/v durante 3 h sob contínua agitação; mais detalhes podem ser vistos na subsubseção 4.1.2.2. No total, vinte e uma diferentes variedades de lúpulo foram utilizadas para a realização do trabalho, as quais são listadas na Tabela 6 juntamente com suas respectivas massas. Os extratos foram inicialmente filtrados utilizando papel de filtro (80 g) e, então, novamente filtrados com filtro de seringa 0,45 μm . Após isso, 400 μL do extrato filtrado foi transferido para um vial de CE, o qual teve seu volume completado para 500 μL com MeOH/H₂O 80:20 v/v. Por fim, uma rápida homogeneização da solução final foi feita em vórtex e esta foi diretamente injetada no sistema de CE.

Tabela 6: Lúpulos comerciais submetidos ao procedimento de extração e posteriormente analisadas por CD-MEKC-UV.

Amostras	m (mg)
Galena	300,0
Columbus	300,0
Styrian Golding	300,1
Saaz	300,8
Magnum	300,1
Fuggle	300,8
Target	300,2
Simcoe	300,6
Amarillo	300,5
Hersbrucker	300,8
Cascade	300,0
Mosaic	300,4
Chinook	300,6
El Dorado	300,1
ER Golding	300,1
Citra	299,9
Herkules	300,3
US Golding	300,0
Northern Brewer	300,0
Nugget	300,5
Mittelfruh	300,0

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

4.2.1.3 Instrumentação

As análises foram realizadas em um equipamento da Agilent 7100 CE (Palo Alto, EUA) equipado com DAD. O *software* HP ChemStation (rev A.06.01) foi utilizado para aquisição e tratamento de dados. Parâmetros como o comprimento total de 48,5 cm (40,0 cm de tamanho efetivo), i.d. de 50 μm (375 μm de o.d.), frequência de aquisição de pontos de 5 Hz e pressão de injeção de 25 mbar foram mantidos constantes para todos os testes. Além disso, o capilar de sílica fundida externamente revestido com poliimida foi adquirido da Polymicro (Phoenix, AZ, USA). Quando um capilar novo foi usado, foi feito um pré-condicionamento com: *flush* de NaOH 1,0 mol L⁻¹ durante 1200 s, *flush* de água deionizada durante 1200 s e *flush* com BGE durante 1200 s. Entre as corridas, o capilar foi lavado e recondicionado com NaOH 1,0 mol L⁻¹, água deionizada e solução de BGE; todos durante 120 s.

4.2.1.4 Otimização dos parâmetros instrumentais de CE

Uma abordagem por planejamento de experimentos pode ser uma elegante e poderosa forma de otimizar variáveis e seus níveis de um sistema de estudo (ASLAN; CEBECI, 2007). Dentro desse contexto, a fim de encontrar as melhores condições empregando o mínimo de experimentos, um planejamento experimental Box-Behnken 3^3 (três fatores em três níveis) com triplicata no ponto central foi aplicado para otimização dos parâmetros instrumentais do CE. Os fatores avaliados nessa etapa foram: voltagem (x_1), tempo de injeção (x_2) e temperatura do cartucho (x_3), sendo seus níveis -1 (baixo), 0 (médio) e 1 (alto) mostrados na Tabela 7. Esses ensaios foram realizados em ordem aleatória, respeitando o princípio da independência, utilizando um extrato de lúpulo. A razão entre a resolução média (R_{med}), considerando todos os pares de picos, e o tempo de migração para o último analito (t_{α_3}) foi usada como resposta (R), como dado pela equação 1:

$$R = \frac{R_{med}}{t_{\alpha_3}} \quad (1)$$

Para calcular os estimadores dos coeficientes de regressão (b_i) juntamente com seus respectivos erros, as equações 2 e 3 foram usadas como descrito a seguir:

$$b_i = (\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \cdot (\mathbf{X}^t \mathbf{Y}) \quad (2)$$

$$erro = [(\mathbf{X}^t \mathbf{X})^{-1} \cdot (s^2)]^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

onde \mathbf{X} é matriz codificada, \mathbf{X}^t é a transposta de \mathbf{X} , as quais apresentam seu produto como uma matriz inversível (elevado a -1), e s^2 é a estimativa da variância calculada a partir da triplicata no ponto central.

Tabela 7: Fatores estudados e seus níveis para o design experimental Box-Behnken 3^3

Fator	Símbolo	Níveis		
		-1 (baixo)	0 (médio)	1 (alto)
Voltagem (kV)	x_1	17	20	23
Tempo de injeção (s)	x_2	3	5	7
Temperatura do cartucho (°C)	x_3	23	25	27

4.2.2 Resultados e discussão

4.2.2.1 Otimização do BGE

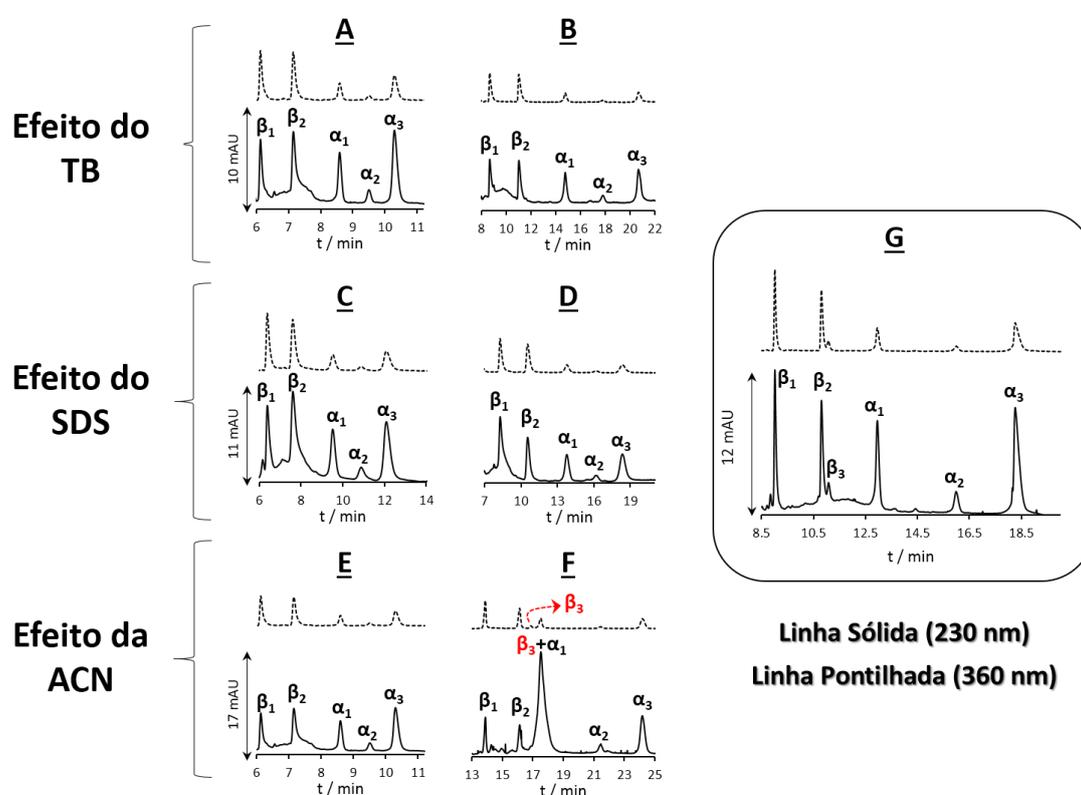
Inicialmente, o BGE para um sistema MEKC foi avaliado submetendo seus constituintes a variações de concentração a fim de entender melhor seus efeitos no mecanismo de separação. Para esse propósito, o mesmo extrato de lúpulo foi usado como amostra. Ademais, para todos os testes de BGE, os seguintes parâmetros foram mantidos constantes: temperatura do cartucho (25 °C), voltagem (+20 kV), injeção (25 mbar/5 s) e capilar (48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm de efetivo; 50 µm i.d.). A otimização foi conduzida por uma abordagem univariada, tomando os componentes TB, SDS e ACN como variáveis.

Vários testes foram realizados, sendo os mais representativos mostrados na Figura 12. Mais de um comprimento de onda foram investigados, mas os comprimentos de onda 230 nm (linha cheia) e o 360 nm (linha pontilhada) foram definidos como os mais adequados para o monitoramento dos analitos. Mesmo o DAD não sendo um sistema de detecção que forneça uma informação inequívoca, os perfis dos espectros eletrônicos de cada uma das classes de compostos (α e β -ácidos) apresentam diferenças características. Nesse sentido, o espectro eletrônico fornecido por cada pico eletroforético foi utilizado para agrupar os compostos dentro da classe correta e, conseqüentemente, diferenciar os α de β -ácidos. Outro ponto interessante, é que o monitoramento dos analitos pode ser feito nos dois comprimentos de onda, mas em cada um deles existem diferenças peculiares que podem se tornar vantagens: em 230 nm, a linha base foi um pouco mais ruidosa, mas o α -ácidos apresentam maiores sinais de acordo com seus espectros na região do ultravioleta. Por outro lado, em 360 nm, os eletroferogramas apresentam uma linha base mais estável, o que pode ser visto como um efeito de seletividade, pois uma menor energia é empregada, mas os sinais dos α -ácidos são atenuados quando comparados com os resultados em 230 nm. Os β -ácidos não apresentam essa atenuação de sinal, o que indica que 360 nm é um comprimento de onda alternativo para o monitoramento dos β -ácidos.

Na Figura 12 A e B, a primeira linha de gráficos mostra o efeito do TB, onde 30,0 e 50,0 mmol L⁻¹ de TB foram usados, respectivamente. A partir dessa comparação, é possível observar cinco picos para ambos os resultados e um aumento no tempo de análise de acordo com o aumento da concentração de TB. Isso é esperado devido ao aumento da força iônica do meio (CIFUENTES; POPPE, 1995), o que poderia também

melhorar a resolução, mas que para esse caso nenhuma melhora significativa foi observada.

Figura 12: Efeito dos constituintes do BGE na separação de α e β -ácidos em extratos de lúpulo por MEKC. Efeito do TB (A e B): de 30,0 para 50,0 mmol L⁻¹; SDS (C e D): de 36,0 para 54,0 mmol L⁻¹; ACN (E e F): de 0 para 20% v/v. BGE otimizado por MEKC (G): 40,0 mmol L⁻¹ de TB, 45,0 mmol L⁻¹ de SDS e 10% v/v de ACN. Parâmetros constantes: temperatura do cartucho (25 °C), voltagem (20 kV), injeção (25 mbar/5 s) e capilar (48,5 cm de comprimento total, 40,0 cm de efetivo; 50 μ m i.d. e 375 μ m o.d.).



A segunda linha de eletroferogramas (Figura 12 C e D) mostra o efeito do SDS. Mesmo aumentando a concentração do surfactante de 36,0 para 54,0 mmol L⁻¹ (Figura 12 C e D, respectivamente), cinco picos foram identificados, mas um aumento no tempo de migração dos analitos foi observado. Isso pode ser explicado pelo maior número de micelas no meio, o que também aumentaria a força iônica, além do aumento do número de interações do tipo analito-micela por conta do maior número de sítios disponíveis. A

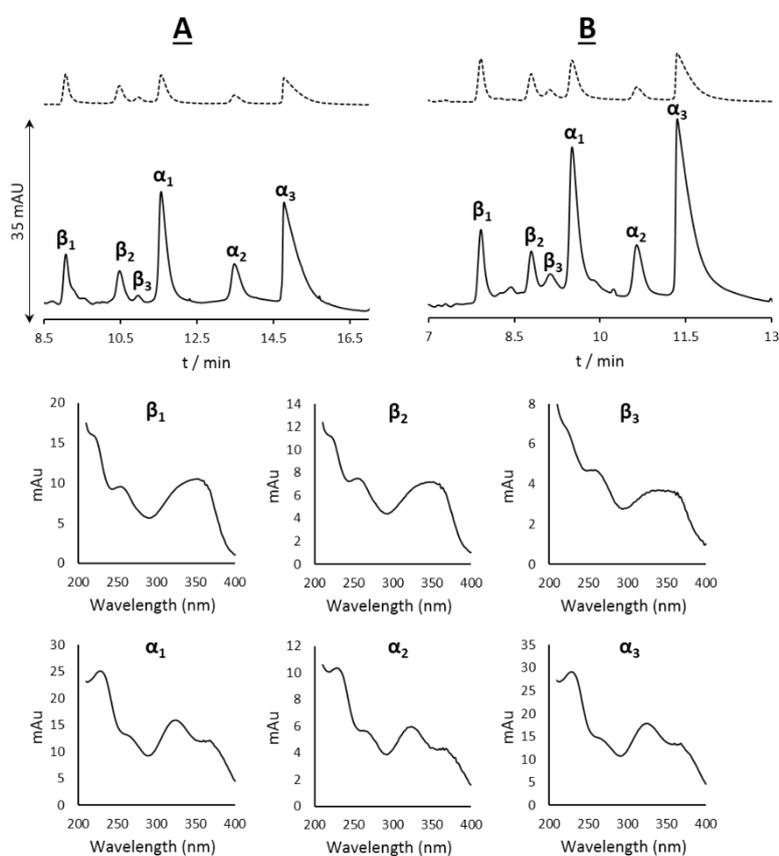
última linha de eletroferogramas mostra o efeito da ACN. Na Figura 12 E, o BGE não continha ACN, sendo constituído apenas de 30,0 mmol L⁻¹ de TB e 45,0 mmol L⁻¹ de SDS, enquanto que na Figura 12 F, 20% v/v de ACN foi adicionado ao BGE. Com 20% v/v de ACN, o tempo de migração dos analitos aumentou consideravelmente, devido a mudanças na viscosidade e na constante dielétrica do meio (PRANAITYTE; PADARAUSKAS, 2006). No entanto, seis picos agora foram observados como pode ser visto pelo eletroferograma com linha pontilhada (360 nm) na Figura 12 F. Em 230 nm não foi possível observar os seis picos por conta de uma aparente comigrações entre β_3 e α_1 .

É importante observar, que nos eletroferogramas A, B, C, D e E (Figura 12) cinco picos foram identificados, enquanto que somente após a adição de um determinado percentual de ACN, o sexto pico foi encontrado. Esse último pico foi atribuído ao β -ácido β_3 (adlupulona). Contudo, um elevado tempo de análise foi obtido, além de um perfil eletroforético com linha base menos estável em 230 nm. Sendo assim, a concentração de ACN foi reduzida para 10% v/v para os próximos testes. Portanto, a Figura 12 G mostra o BGE para o sistema MEKC, composto por 40,0 mmol L⁻¹ de TB, 45,0 mmol L⁻¹ de SDS e 10% v/v de ACN. Nesse último eletroferograma é mais nítida a identificação do β_3 . As classes α e β -ácidos foram identificadas e diferenciadas entre si pela avaliação do perfil do espectro eletrônico na região do UV como mostrado na Figura 13.

O sistema MEKC foi adequado para a completa separação dos α e β -ácidos no extrato de lúpulo como mostrado na Figura 12 G, mas isso ainda poderia ser melhorado, principalmente no que diz respeito à separação do par mais crítico β_2/β_3 . Outrossim, o modo CD-MEKC não havia sido testado anteriormente para esse tipo de separação e a inclusão da β -CD poderia ainda melhorar a separação de todos homólogos e isômeros presentes no lúpulo. Dessa forma, 20,0 mmol L⁻¹ de β -CD foi adicionado ao BGE previamente desenvolvido para MEKC. Com a inclusão da β -CD (Figura 13A), o tempo de análise diminuiu quando comparado com sistema por MEKC (Figura 12 G) e a resolução do par crítico β_2/β_3 aumentou. É importante destacar que os eletroferogramas mostrados na Figura 13 dizem respeito a dois lúpulos diferentes. Por conta disso, os teores de α e β -ácidos são diferentes, o que pode ser percebido quando as áreas dos α -ácidos dos eletroferogramas da Figura 13A e Figura 12 G são comparados, visto que a diluição e os parâmetros instrumentais são os mesmos. A diferença no tempo de

migração dos analitos quando comparado esses dois eletroferogramas pode ser por conta de efeito de matriz entre as duas plantas, mas também por variações instrumentais visto que esses testes foram executados em dias diferentes e o sistema ainda não estava completamente otimizado.

Figura 13: (A) Inclusão de 20,0 mmol L⁻¹ de β -CD no BGE criando o modo CD-MEKC-UV; (B) Efeito do TB quando 30,0 mmol L⁻¹ é usado no BGE em comparação com 40 mmol L⁻¹ do eletroferograma A. Os espectros eletrônicos na região do UV são mostrados para todos analitos.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

No BGE para o sistema CD-MEKC-UV, a concentração de TB foi de 40,0 mmol L⁻¹, mas considerando o teste do efeito da concentração de TB no sistema MEKC, Figura 12 (A e B), a diminuição da concentração de TB poderia não comprometer a separação dos compostos, mantendo a resolução entre os picos e diminuindo o tempo de análise. Portanto, o mesmo teste foi feito para o sistema CD-MEKC-UV, agora

diminuindo a concentração de TB para 30,0 mmol L⁻¹ e mantendo os teores de β-CD, SDS e ACN em 20,0 mmol L⁻¹, 45,0 mmol L⁻¹ e 10% v/v, respectivamente. Houve um ganho significativo no tempo de análise e o poder de separação do método não foi alterado como é mostrado na Figura 13 B. Além disso, os sinais para α e β-ácidos foram maiores quando 30,0 mmol L⁻¹ de TB foi usado no BGE.

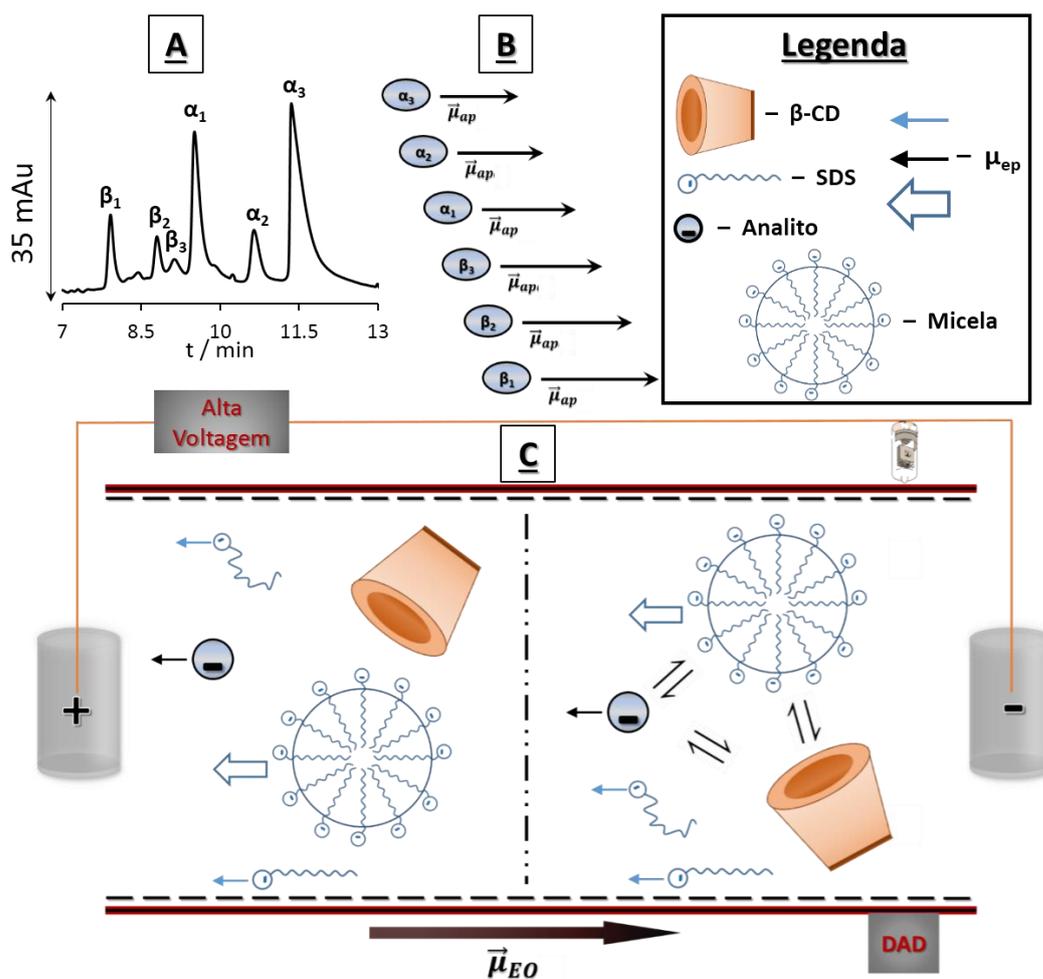
A identificação dos picos eletroforéticos foi feita pela avaliação dos espectros UV das classes de α e β-ácidos, os quais são bem conhecidos e descritos na literatura. Os primeiros três picos eletroforéticos correspondem aos β-ácidos, os quais podem ser confirmados pelos três espectros superiores da Figura 13. Os três últimos picos eletroforéticos dizem respeito aos α-ácidos, estes que podem ser confirmados pelos três espectros inferiores da Figura 13.

Para o melhor entendimento da ordem de migração dos analitos, uma discussão mais aprofundada levando em consideração a proposta de um mecanismo de separação por CD-MEKC-UV é introduzido na Figura 14. Quando o capilar é preenchido com o BGE para CD-MEKC-UV, temos uma fase contendo o meio tamponado pela solução de TB e os seletores que funcionam como pseudo-fases estacionárias, sendo eles: as micelas aniônicas e as β-CDs neutras. Quando a voltagem é aplicada, os analitos aniônicos que se encontram no meio tamponado migram em contra-fluxo em sentido ao detector de acordo com suas μ_{ep} , mas também interagem de maneira diferenciada com os seletores de maneira que a μ_{ap} se torne diferente, o que é percebido pela completa separação e detecção diferenciada dos analitos. Um esquema é mostrado na Figura 14C.

Uma explicação a nível molecular da interação dos analitos aniônicos com os seletores não é tarefa simples de ser feita, principalmente envolvendo a interação do analito aniônico com a micela aniônica. Uma elegante forma de entender melhor essas interações seria por meio de modelagem computacional, realizando cálculos quânticos e de dinâmica molecular. No entanto, uma possível explicação leva em consideração que o interior da micela e da β-CD são hidrofóbicas e que os compostos, dentro de cada classe (α e β-ácidos), apresentam diferentes substituintes alquilas no grupo R (Figura 1), apesar do núcleo de suas estruturas moleculares serem o mesmo. Os homólogos co-, para ambas as classes, são mais facilmente separados visto que eles apresentam um carbono a menos, mas os isômeros posicionais n- e ad- apresentam uma mobilidade eletroforética muito parecida, o que torna necessária a interação desses compostos com

algum seletor. Após as interações analito/seletor, considerando as características intrínsecas dos compostos, os compostos alcançam o detector em diferentes tempos, sendo a ordem de migração (Figura 14A e B) dada por: colupulona (β_1), lupulona (β_2), adlupulona (β_3), cohumulona (α_1), adhumulona (α_2) and, humulona (α_3).

Figura 14: (A) Eletroferograma de um extrato lipídico por CD-MEKC; (B) ordem de migração dos analitos; (C) esquema do mecanismo de separação para CD-MEKC-UV



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

4.2.2.2 Otimização instrumental

Após a otimização do BGE para o sistema CD-MEKC, um ajuste fino dos parâmetros instrumentais foi feito utilizando o planejamento experimental Box-Behnken 3^3 . Três fatores em três níveis foram investigados como mostrado na Tabela 7 e as resposta calculadas para selecionar os melhores experimentos (equação 1),

são mostradas na Tabela 8. Os estimadores dos coeficientes de regressão e os efeitos dos fatores estudados, bem como os de suas interações, são mostrados na Tabela 9.

Tabela 8: Matriz do planejamento Box-Behnken 3^3 codificada. Voltagem, tempo de injeção e temperatura do cartucho foram usados como fatores em três níveis.

	X_1^a	X_2^b	X_3^c	R^d
1	-1,0	-1,0	0,0	0,1730
2	1,0	-1,0	0,0	0,2364
3	-1,0	1,0	0,0	0,1555
4	1,0	1,0	0,0	0,2358
5	-1,0	0,0	-1,0	0,1340
6	1,0	0,0	-1,0	0,2053
7	-1,0	0,0	1,0	0,1621
8	1,0	0,0	1,0	0,2265
9	0,0	-1,0	-1,0	0,1954
10	0,0	1,0	-1,0	0,1690
11	0,0	-1,0	1,0	0,2111
12	0,0	1,0	1,0	0,1848
13	0,0	0,0	0,0	0,1994
14	0,0	0,0	0,0	0,1934
15	0,0	0,0	0,0	0,1868

^a X_1 - V (kV): (-1) 17 (0) 20 (1) 23 | ^b X_2 - t (s): (-1) 3 (0) 5 (1) 7 | ^c X_3 - T (°C): (-1) 23 (0) 25 (1) 27

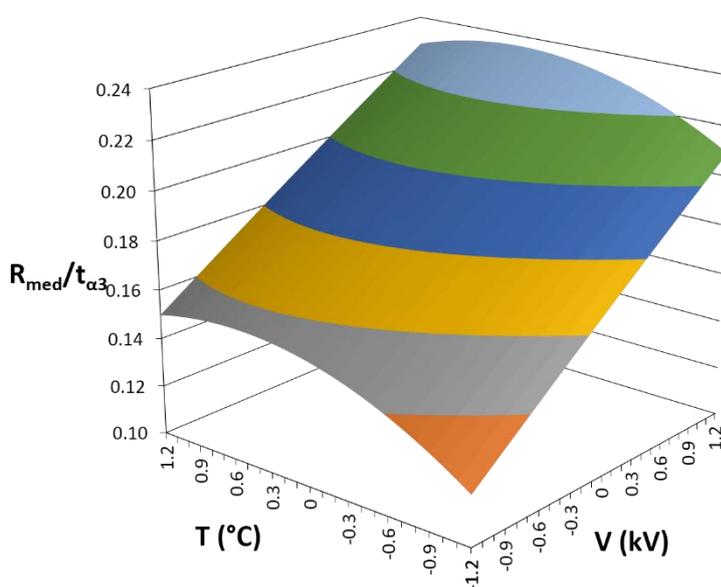
^d $R = R_{med}/t_{\alpha 3}$

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Do ponto de vista estatístico, considerando 95% de confiança, três dos coeficientes calculados foram significativos, incluindo a média, visto que eles não contém o zero em seus intervalos (Tabela 9). Todos os estimadores dos coeficientes de regressão foram usados para construir o modelo, sendo este avaliado pela análise de variância (ANOVA) para atestar sua validade. Como o p-valor foi maior que a significância do teste aplicado (p-valor=0,3999), considerando um nível de confiança de 95%, o modelo não apresentou falta de ajuste, o que permite a construção de um gráfico de superfície de respostas. A significância do modelo ($F_{calc}=24,64$) foi pelo menos cinco vezes superior ao F_{crit} (4,77) e o máximo da variância explicada foi de 99,35%. Como x_1 (V) e x_2 (T) foram significativos, esses parâmetros foram avaliados em modelagem de

superfície de resposta contra a resposta calculada, como mostrado pela Figura 15. A superfície de resposta mostra mais altas respostas para o nível alto de voltagem e intermediário de temperatura. Juntamente com a análise da superfície de respostas, os eletroferogramas relacionados aos ensaios feitos no planejamento Box-Behenken 3^3 são mostrados na Figura 16, sendo que em todos eles a separação completa dos α e β -ácidos foi alcançada.

Figura 15: Superfície de respostas para avaliação de temperatura e voltagem na otimização de parâmetros instrumentais de CE



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Portanto, avaliando a superfície de respostas (Figura 15), os eletroferogramas (Figura 16) e as melhores resposta dadas na Tabela 8, os ensaios 2 e 4 providenciaram os melhores resultados. Ambos estão de acordo com os níveis que a superfície indica como melhores, visto que os níveis alto e intermediário foram considerados para V e T, respectivamente. No entanto, avaliando pela Tabela 8, os valores de resposta são muito próximos e não é possível decidir entre o melhor experimento. Comparando os eletroferogramas (Figura 16), as condições do ensaio 4 foram definidas como ótima, visto que para os ensaios 2 e 4 um tempo similar foi observado, a separação total foi

alcançada, mas no ensaio 4 maiores sinais foram observados sem comprometer a resolução eletroforética.

Assim, as condições finais otimizadas para o método por CD-MEKC-UV foram: BGE composto de 30,0 mmol L⁻¹ de TB, 45,0 mmol L⁻¹ de SDS, 20,0 mmol L⁻¹ de β-CD, 10% v/v de ACN; temperatura do cartucho de 25 °C; voltagem positiva de 23 kV; injeção hidrodinâmica aplicando 25 mbar durante 7,0 s; comprimento total do capilar de 48,5 cm (40,0 cm de comprimento efetivo), 50 μm i.d. e 375 μm o.d. Para as vinte e uma amostras analisadas, os analitos foram monitorados em 230 nm (5 Hz).

Tabela 9: Coeficientes de regressão e avaliação dos efeitos através de cálculos através do intervalo de significância

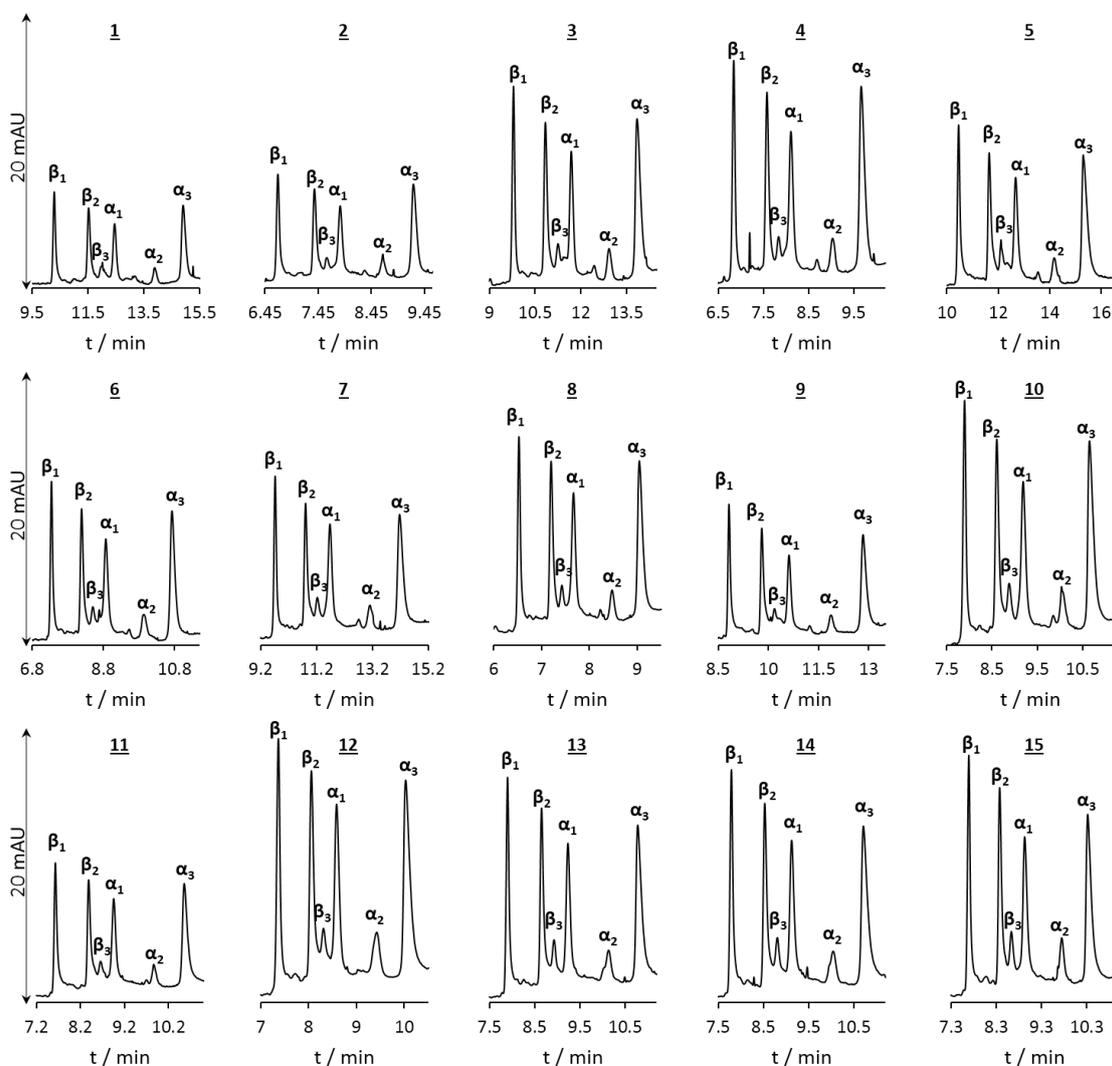
	Estimadores dos coeficientes de regressão	Significância do intervalo		Significância ^a
		De	Até	
b0	0,193220	0,177616	0,208824	+
b1	0,034926	0,025371	0,044482	+
b2	-0,008850	-0,01841	0,000705	-
b3	0,010098	0,000543	0,019654	+
b11	-0,000574	-0,01464	0,013492	-
b22	0,007515	-0,00655	0,02158	-
b33	-0,010669	-0,02473	0,003396	-
b12	0,004218	-0,0093	0,017732	-
b13	-0,001727	-0,01524	0,011786	-
b23	0,000037	-0,01348	0,01355	-

^a (+) Fatores significativos | (-) Fatores não significativos

* $t_{crit}=4,303$ (dois graus de liberdade)

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 16: Eletroferogramas do planejamento experimental Box-Behnken 3^3 para otimização dos parâmetros instrumentais. Condições fixas: BGE composto de 30 mmol L^{-1} de TB, 45 mmol L^{-1} de SDS, 20 mmol L^{-1} de β -CD e 10% v/v de ACN; 25 mbar; comprimento total do capilar de 48, cm (40 cm efetivo), 50 μm i.d. e 375 μm o.d.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

4.2.2.3 Estado da arte em separação de α e β -ácidos

Considerando a separação dos homólogos e isômeros dos α e β -ácidos, uma comparação dos resultados obtidos nesse trabalho com alguns trabalhos encontrados na literatura foi feita como mostrado na Tabela 10. Trabalhos considerando as técnicas de CE e LC foram avaliadas. Os mais importantes parâmetros, tais como preparo de amostras, constituintes da fase móvel (FM) ou BGE, tempo de separação e número de

amostras foram levados em consideração. Outro interessante parâmetro de comparação foi o de número de picos resolvidos referentes aos analitos (α e β -ácidos). Em outras palavras, número de picos igual a seis significa a separação total dos compostos, enquanto que quando esse valor foi igual a quatro por exemplo, relacionou-se com a comigração entre os isômeros n- e ad-, para α e β -ácidos.

Considerando os trabalhos envolvendo CE, utilizando CZE não foi possível uma separação de todos os homólogos e isômeros de α e β -ácidos. Para os trabalhos de CZE, os tempos de separação foram superiores aos obtidos nesse trabalho e o número máximo de picos foi igual a quatro, como descrito por Duarte et al. (2018) e Kornyzova et al. (2009), o que leva a duas comigrações entre os isômeros n- e ad- para ambas as classes. O trabalho de Villalba et al. (2006) mostra picos não resolvidos no eletroferograma de pico base, mas pelo eletroferograma de íons extraídos no detector de MS foi possível identificar quatro homólogos de α e β -ácidos, visto que os isômeros n- e ad- apresentam a mesma fórmula molecular. Por MEKC, trabalhos empregando SDS como surfactante para geração de micelas foram encontrados e em todos eles, cinco picos foram identificados. O trabalho de Vindevoguel et al. (1990) descreve que a identificação do sexto pico (adlupulona) não foi reproduzível. O trabalho desenvolvido por Royle et al. (2001) atribui o segundo pico eletroforético como “n- e/ou adlupulona”.

Considerando os métodos por LC, foram encontrados trabalhos com duas coeluições (4 picos) e trabalhos em que a separação total foi conseguida (seis picos). Diferentes colunas, FM e programas foram testados. Os trabalhos de Verzele *i.* (1980b) e o primeiro sistema testado por Ceslova et al. (2009) identificaram 4 picos (confirmado por MS), ou seja, coeluição entre os isômeros n- e ad-. Apesar do trabalho de Pusecker et al. (1999) também ter identificado 4 picos na etapa cromatográfica, os isômeros n- e ad- foram inequivocamente identificados no sistema de detecção de ^1H NMR, permitindo a diferenciação do substituinte alifático do grupamento acil. No trabalho de Vanhoenacker et al. (2001), cinco picos foram identificados para α e β -ácidos, sendo que o primeiro β -ácido foi somente apontado, visto que apresentava coeluição com o último α -ácido; o foco desse trabalho foi nos α -ácidos isomerizados, uma vez que cerveja foi a amostra analisada. Uma separação total dos homólogos e isômeros dos α e β -ácidos por LC foi alcançada por Ceslova et al. (2009) e Kao et al. (2013). Esses trabalhos utilizaram colunas de fase reversa (C8 e C18, respectivamente) e após um

gradiente de eluição, apesar de terem sido usadas diferentes FM, picos bem resolvidos foram encontrados em uma corrida cromatográfica em torno de 30 minutos.

Avaliando e comparando o método proposto por CD-MEKC-UV com os disponíveis na literatura e listados na Tabela 10, algumas vantagens podem ser apontadas, tais como: seletividade na separação, visto que todos os homólogos e isômeros foram adequadamente identificados; elevada frequência analítica, visto que os tempos de separação considerando a separação total dos analitos foram mais baixos; ampla aplicabilidade, pois vinte e uma diferentes variedades de lúpulo foram avaliadas (discutido na próxima seção); elevada precisão do método, pois baixos erros relativos para tempo de migração e área dos analitos foram obtidas (Tabela 11); as duplicatas de todas as amostras foram muito semelhantes (Figura 17).

Tabela 10: Comparação entre o método proposto e literatura para separação de α e β -ácidos considerando as técnicas de CE e LC.

Ref	Amostra	Preparo de amostra	Técnica de Separação/Modo	Coluna/Capilar	FM/BGE	Condições de Separação	Detecção	Tempo (min)	Picos	Número de amostras	Ano
Atual	Lúpulo em Pellets	Extração com MeOH/H ₂ O 80:20 v/v	CE/CD-MEKC	Capilar: 48,5 cm total/40,0 cm efetivo (50 μ m i.d.)	BGE: 30,0 mmol L ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇ , 45,0 mmol L ⁻¹ SDS, 10% v/v ACN, 10 mmol L ⁻¹ β -CD	Temperatura 25 °C; Voltagem +23 kV; Injeção Hidrodinâmica 25 mbar/7 s	UV-DAD (230 nm)	7,8	6	21	2018
28	Extrato	Não informado	CE/CZE	Capilar: 80,0 cm total/50 cm efetivo (100 μ m i.d.)	BGE: 50 mmol L ⁻¹ TRIS/Acético ácido	Voltagem +23 kV	UV-DAD (220 nm)	16	2	-	1990
24	Lúpulo em Pellets	Extração com Acetona/H ₂ O 75:25 v/v	CE/CZE	Capilar: 100 cm total (50 μ m i.d.)	BGE: 160 mmol L ⁻¹ carbonato de amônio / hidróxido de amônio	Voltagem +20 kV; Hidrodinâmica injeção 0,5 psi/7 s	ESI-MS (sheath liquid 2-propanol/H ₂ O 50:50 v/v com 0,1% trietilamina)	25	Não resolvido na CE	2	2006
25	Lúpulo em Pellets	Clean up com Hexano / Extração com MeOH (triplicata)	CE/CZE	Capilar: 100 cm total (50 μ m i.d.)	BGE: 80 mmol L ⁻¹ acetato de amônio/ Hidróxido de amônio	Voltagem +25 kV; Injeção Hidrodinâmica 0,5 psi/10 s	ESI-MS sheath liquid 2-propanol/H ₂ O 60:40 v/v com 0,1% trietilamina)	35	3	4	2006

Ref	Amostra	Preparo de amostra	Técnica de Separação/Modo	Coluna/Capilar	FM/BGE	Condições de Separação	Deteção	Tempo (min)	Picos	Número de amostras	Ano
23	Lúpulo em Cones	Extração com MeOH	CE/CZE	Capilar: 68,5 cm total/60,0 cm efetivo (50 µm i.d.)	BGE: 25 mmol L ⁻¹ NaH ₂ PO ₄ + 60 mmol L ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇	Temperatura 20 °C; Voltagem +30 kV; Hidrodinâmica injeção 150 mbar/1 s	UV-DAD (230 e 345 nm)	9	4	15	2009
26	Lúpulo em Pellets	Extração com MeOH/H ₂ O 80:20 v/v	CE/CZE	Capilar: 62,5 cm total/54 cm efetivo (50 µm i.d.)	BGE: 160 mM carbonato de amônio	Temperatura 25 °C; Voltagem +20 kV; Hidrodinâmica injeção 25 mbar/5 s	UV-DAD (230nm)	16,5	4	16	2018
28	Extrato	Não informado	CE/MECK	Capilar: 100,0 cm total/50 cm efetivo (100 µm i.d.)	BGE: 25mM TRIS/HAc + 25 mM SDS	Voltagem +12 kV	UV-DAD (220 nm)	18	5	-	1990
29	Extrato de Lúpulo	Extração com fluido supercrítico com CO ₂ (6 MPa e 10° C	CE/MECK	Capilar: 64,5 cm total/54 cm efetivo (50 µm i.d.)	BGE: 50 mmol L ⁻¹ TB, 40 mmol L ⁻¹ SDS	Voltagem +25 kV; Hidrodinâmica injeção 50 mbar/5 s	UV-DAD (200 nm)	30	5	4	2001
30	Lúpulo em cones	Extração com fluido supercrítico com CO ₂ (350 bar e 35° C	CE/MECK	Capilar: 60 cm total/56 cm efetivo (50 µm i.d.)	BGE: 50 mmol L ⁻¹ TB, 40 mmol L ⁻¹ SDS	Voltagem +25 kV; Hidrodinâmica injeção 320 mbar/0,2 s	UV-DAD (200 nm)	Sem escala de tempo	2	1	2013
15	Lúpulo em Pellets	Extração com Tolueno + 1% BHT	HPLC	Rsil-C18 (17%)	FM: 85 mL MeOH + 17 mL H ₂ O + 0,25 mL H ₃ PO ₄ 85% + 1 g BHT	Isocrático: Taxa de fluxo de 2,0 mL min ⁻¹	UV(314 nm)	10	4	5	1980

Ref	Amostra	Preparo de amostra	Técnica de Separação/Modo	Coluna/Capilar	FM/BGE	Condições de Separação	Detecção	Tempo (min)	Picos	Número de amostras	Ano
16	α e β -ácidos isolados	Dissolução em ACN/H ₂ O 80:20 v/v com 1% de ácido acético	HPLC	PRP-1 (150 x 4 mm)	FM: (A) ACN/H ₂ O 20:80 v/v com 0,05 mol L ⁻¹ acetato de amônio (B) ACN/H ₂ O 90:10 v/v com 0,05 mol L ⁻¹ acetato de amônio	Isocrático: Taxa de fluxo de 0,8 mL min ⁻¹	ESI-MS	25	4 (resolvido no MS)	-	1998
16	α e β -ácidos isolados	Dissolução em ACN/H ₂ O 80:20 v/v com 1% de ácido acético	HPLC	C8 (150 x 4,6 mm)	FM: MeOH/H ₂ O 90:10 v/v com 1% of acético ácido	-	ESI-MS	9	4 (resolvidos no MS)	-	1998
19	Extrato de Lúpulo	Extração com fluido supercrítico (CO ₂)	HPLC	ODS-0 AB (250 x 4 mm; 5 μ m)	FM: (A) ACN (0,05% H ₃ PO ₄) (B) D ₂ O (0,05% H ₃ PO ₄)	Isocrático: (A:B) 60:40 v/v Taxa de fluxo de 0,3 mL min ⁻¹	NMR	Acima de 100	4 (ad-isômeros resolvidos por ¹ H NMR)	1	1998
17	Lúpulo em Pellets	Extração pressurizada com solvent (EtOH)	HPLC	C18 (250 x 4 mm; 5 μ m)	850 mL MeOH + 190 mL H ₂ O + 5 mL ácido ortho-fosfórico	Isocrático: Taxa de fluxo de 0,9 mL min ⁻¹ Coluna Temperatura de 35° C	DAD (314nm)	23	Não mostrado	9	2009
20	Extrato de Lúpulo	Extração com fluido supercrítico (CO ₂)	HPLC	Ultracarb ODS (150 x 3,2 mm; 5 μ m)	FM: (A) ACN:H ₂ O (40:60) com ácido fórmico 0,3% (B) ACN	Gradiente: 0-40 min (A:B) 40:60 v/v; a partir de 40 min 100% (B) Taxa de fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ Temperatura das Colunas de 40° C	UV-DAD (330nm) / APCI-IT-MS	35	4	7	2009

Ref	Amostra	Preparo de amostra	Técnica de Separação/Modo	Coluna/Capilar	FM/BGE	Condições de Separação	Deteção	Tempo (min)	Picos	Número de amostras	Ano
20	Extrato de Lúpulo	Extração alcoólica	HPLC	C8 (250 x 4 mm; 5 µm)	FM: (A) ACN:H ₂ O (40:60) com 0,3% de ácido fórmico (B) ACN	Gradiente: 0-40 min (A:B) 40:60 v/v; a partir de 40 min 100% (B) Taxa de fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ Coluna Temperatura 40° C	UV-DAD (330nm) / APCI-IT-MS	35	6	7	2009
27	Padrão/Cerveja	-	LC	C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm)	FM: (A) 5 mmol L ⁻¹ Acetato de Amônio em 20% etanol v/v (B) ACN/etanol 60:40 v/v	Gradiente: (A:B) 100:0 até 3 min; (A:B) 84:16 v/v até 4 min; (A:B) 60:40 v/v até 54 min; (A:B) 5:95 v/v até 57 min; (A:B) 5:95 v/v manter até 65 min Taxa de fluxo de 1,0 mL min ⁻¹ Coluna: Temperatura 35° C	UV-DAD (330nm) / APCI-IT-MS (modo negativo)	55	5	-	2009
21	Padrão/Cerveja	-	HPLC	C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm)	FM: (A) Ácido fosfórico (B) CAN	Gradiente: (A:B) 65:35 até 3 min; (A:B) 45:55 v/v até 6 min; manter por 4 min; (A:B) 40:60 v/v em 15 min; (A:B) 30:70 v/v em 20 min; (A:B) 25:75 v/v em 30 min Taxa de fluxo de 1,5 mL min ⁻¹ Coluna: Temperatura 35 °C	UV-DAD (314nm) / APCI-IT-MS (modo positivo)	38	6	-	2013
18	Lúpulo em Pellets	Extração com fluido supercrítico com CO ₂ (30 MPa e 50° C)	HPLC	C18 (200 x 2,1 mm; 1,9 µm)	FM: (A) H ₂ O com 0,1% trifluoroacético ácido (B) (ACN:H ₂ O com 0,1% ácido trifluoroacético) 90:10 v/v	Gradiente: (A:B) 35:65 até 14 min; (A:B) 0:100 v/v em 20 min; (A:B) 35:65 v/v em 24 min; manter por 6 min Taxa de fluxo de 0,4 mL min ⁻¹	UV-DAD (314nm)	-	-	5	2015

4.2.2.4 Aplicando o método otimizado por CD-MEKC a outras variedades de lúpulo

Com o método otimizado por CD-MEKC-UV, vinte e uma amostras de lúpulo foram submetidas à extração e então analisadas. As amostras foram injetadas em duplicata no sistema de CE. Na Figura 17 são exibidos os eletroferogramas de todas as amostras de lúpulo em uma mesma escala, de maneira que seja possível uma comparação direta entre os teores de α e β -ácidos.

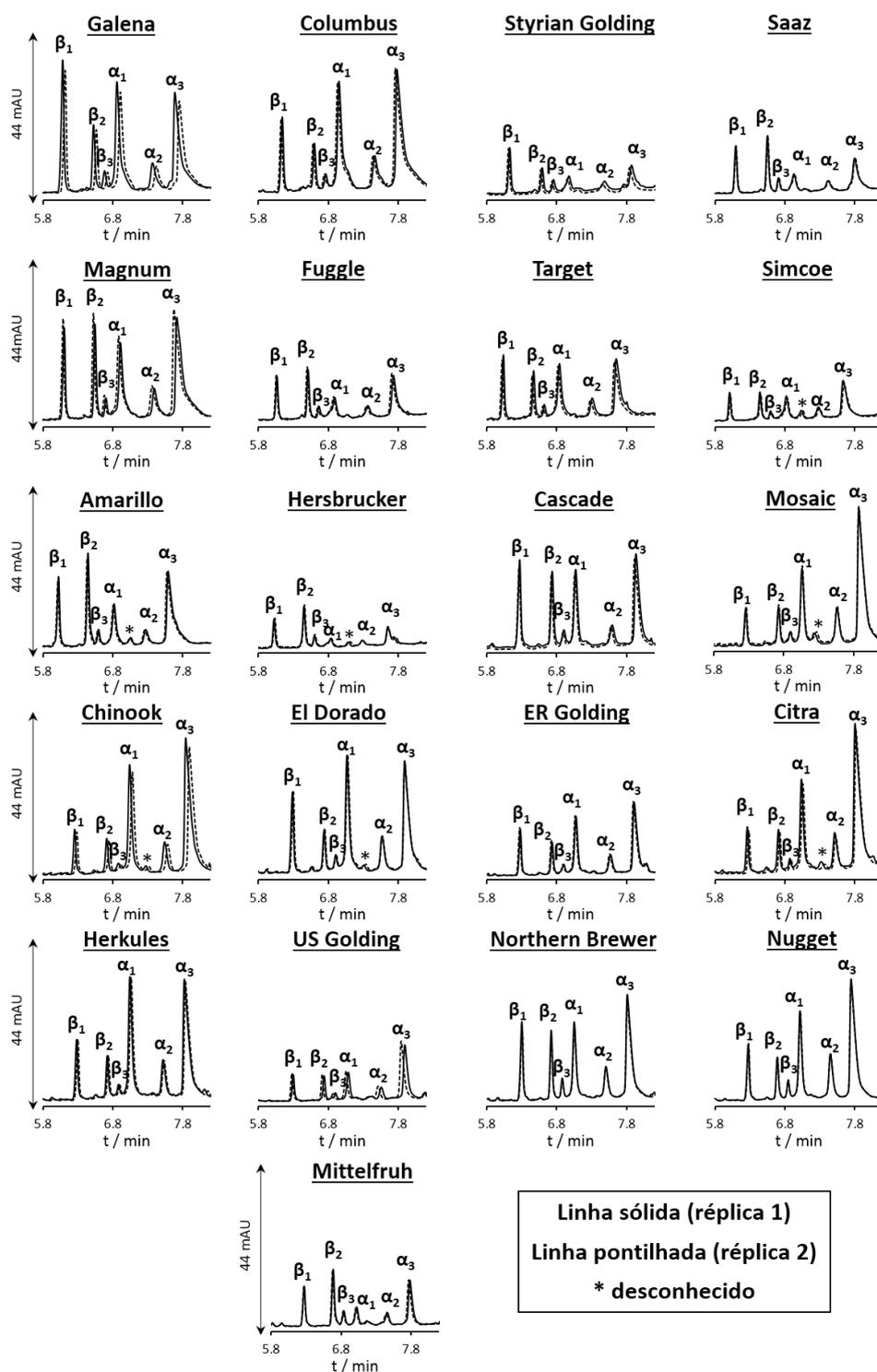
Cada variedade de lúpulo apresenta características próprias, sendo mais comum classificar os lúpulos em “lúpulos de amargor” ou “lúpulo de aroma”, basicamente devido ao teor de α -ácidos. Para o produtor de cerveja, essa é uma importante informação, visto que uma cerveja mais amarga ou mais aromatizada pode ser produzida pela utilização de lúpulos específicos. Assim, quando aplicado o método otimizado às diferentes variedades de planta, foi possível notar o potencial perfil de amargor que cada uma produz.

Como já estabelecido no mercado mundial, alguns lúpulos de amargor são: Galena, Columbus, Herkules e Nugget (ALMAGUER et al., 2014). Os eletroferogramas dessas amostras (Figura 17) estão de acordo com a literatura, visto que áreas com elevados valores para os α -ácidos foram observadas. Por outro lado, alguns lúpulos mais aromáticos podem ser exemplificados por Saaz, Hersbrucker e Mittelfruh (ALMAGUER et al., 2014), sendo que os eletroferogramas mostram baixos valores de área para os α -ácidos. Além dos lúpulos previamente mencionados, outros com a finalidade aromatizante e de amargor foram analisados e as diferenças entre os α e β -ácidos podem ser observadas.

Outra observação importante foi com relação à grande similaridade das replicatas para todas as amostras, o que pode ser visto quando comparados os eletroferogramas com linhas cheias e pontilhadas na Figura 17; as áreas e tempos de migração foram muito semelhantes. Para confirmar a precisão do método por CD-MEKC-UV, testes para precisão intradia e interdia foram realizadas em quadruplicatas. Os dados para área e tempos de migração para os seis α e β -ácidos são reportados na Tabela 11. A mesma amostra de lúpulo (Galena) foi usada para realizar esses testes. Considerando os testes intradia, em geral, no dia 1, o desvio padrão relativo (DPR) para área e tempos de migração foram mais elevados que para o dia 2. Os maiores valores de DPR considerando área e tempos de migração foram 5,16% (dia 2 para β_3) e 1,62% (dia 1 para β_3) respectivamente, enquanto que os menores DPR foram

0,44% (dia 2 para β_1) e 0,34% (dia 1 para β_1) respectivamente. Para os testes interdía, os maiores valores de DPR para áreas e tempos de migração foram 6,92% para α_3 e 1,33% para β_3 , enquanto que os menores valores de DPR foram 1,46% e 0,50% respectivamente, ambos para α_1 . É interessante destacar que, os maiores DPR foram encontrados para β_3 , este que apresenta os menores sinais e a mais difícil a separação.

Figura 17: Eletroferograma de vinte e uma amostras de lúpulo injetados em duplicata. Condições eletroforéticas: BGE composto de 30,0 mmol L⁻¹ de TB, 45,0 mmol L⁻¹ de SDS, 20,0 mmol L⁻¹ de β-CD e 10% v/v de ACN; temperatura do cartucho de 25 °C; voltagem positiva de 23 kV; injeção hidrodinâmica de 25 mbar/7,0 s; comprimento total do capilar de 48,5 cm (40,0 cm efetivo), 50 μm i.d. e 375 μm o.d



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Tabela 11: Testes de precisão intradia e interdia para avaliação da precisão do método considerando áreas e tempo de migração para todos os seis α e β -ácidos

Dia 1													
	β_1		β_2		β_3		α_1		α_2		α_3		
	A (mAu)	t_m (min)	A (mAu)	t_m (min)	A (mAu)	t_m (min)	A (mAu)	t_m (min)	A (mAu)	t_m (min)	A (mAu)	t_m (min)	
Galena 1	91,81	6,08	42,65	6,52	11,41	6,68	122,4	6,86	31,91	7,36	131,41	7,68	
Galena 2	87,45	6,11	41,21	6,56	11,72	6,72	118,55	6,9	30,89	7,42	132,22	7,74	
Galena 3	84,77	6,14	40,22	6,59	11,41	6,76	118,07	6,94	31,79	7,46	121,33	7,79	
Galena 4	89,85	6,14	42,29	6,58	10,47	6,93	120,72	6,93	29,99	7,45	129,46	7,78	
Intradia 1 DPR (%)	3,44	0,47	2,65	0,47	4,81	1,62	1,67	0,52	2,87	0,61	3,88	0,64	
Dia 2													
Galena 1	98,68	6,088	45,25	6,554	10,68	6,72	118,71	6,917	32,23	7,458	143,55	7,8	
Galena 2	98,08	6,06	45,66	6,515	11,92	6,68	122,4	6,87	31,2	7,4	145,97	7,74	
Galena 3	98,07	6,05	45,9	6,51	11,96	6,67	118,85	6,87	33,94	7,39	143,62	7,73	
Galena 4	98,94	6,04	44,54	6,49	11,53	6,65	119,14	6,85	32,82	7,36	147,21	7,69	
Intradia 2 DPR (%)	0,44	0,34	1,31	0,41	5,16	0,44	1,47	0,41	3,52	0,55	1,25	0,59	
Interdia DPR (%)	6,10	0,64	4,98	0,55	4,79	1,33	1,46	0,50	3,80	0,56	6,92	0,57	

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

4.2.3 Conclusão

Foi proposto um método por CD-MEKC-UV para a separação dos homólogos e isômeros α e β -ácidos em amostra de lúpulo. O método por CD-MEKC-UV foi otimizado levando em consideração o estudo do BGE e pela aplicação da abordagem multivariada por meio de um planejamento experimental Box-Behnken 3^3 para um ajuste fino dos parâmetros instrumentais de CE. Quando comparado com outros métodos disponíveis (por CE e LC) para a separação total dos homólogos e isômeros dos α e β -ácidos, o proposto método provou ser mais rápido e de mais ampla aplicabilidade, visto que menores tempos de análise foram obtidos e diferentes variedades de lúpulo foram levadas em consideração. Ademais, o método apresentou baixos valores de DPR para os tempos de migração e áreas dos analitos estudados, considerando testes intradia e interdia. O método otimizado foi aplicado a vinte e uma diferentes variedades de lúpulo com alta eficiência. O método proposto é simples, rápido, reprodutível e segue as premissas da química verde, visto que usa baixas concentrações de um simples sistema tampão, do surfactante, da ACN e do β -CD. Nesse sentido, esse método pode ser interessante para controle de qualidade considerando produtores de lúpulo e para pesquisadores da indústria cervejeira.

5 TERPENOS

O óleo essencial sintetizado pela planta lúpulo é extraído juntamente com os compostos precursores do amargor na cerveja durante a etapa de fervura do mosto. Lúpulos secos contém cerca de 0,5-3,0% de óleo essencial, sendo que esse óleo pode ser constituído por mais de 1000 compostos (ALMAGUER et al., 2014). Sua composição é dada em maior parte por terpenos (~70%), sendo os demais 30% correspondentes a compostos oxigenados como ésteres, aldeídos, cetonas, ácidos e álcoois (GONÇALVES et al., 2012). Os terpenos, embora sejam hidrocarbonetos e, portanto, não apresentando elevada solubilidade na cerveja, são os principais contribuintes para o aroma da cerveja em virtude de seu alto poder de detecção sensorial. Diferentes variedades de lúpulos produzem diferentes óleos essenciais, estes que por sua vez, podem diferir drasticamente em aroma, sabor e odor, de acordo como a sua constituição química.

Os lúpulos podem ser classificados entre lúpulos de amargor e aroma quando julgados somente pelo teor de α -ácidos, mas também pode ser feita uma classificação mais fina levando em consideração o perfil aromático, onde três classes podem ser separadas, sendo elas: aroma (AR), alto amargor (AM) e amargor com características aromáticas, também chamadas de duplo propósito (DP) (DE COOMAN; EVERAERT; DE KEUKELEIRE, 1998; SHELLIE et al., 2009). Uma outra classificação dentro do conjunto de aroma pode ser feito, considerando lúpulos com “fino aroma” ou somente de “aroma” (LEONARDI et al., 2013).

Os principais terpenos encontrados nos lúpulos são o monoterpeno β -mirceno e os sesquiterpenos β -cariofileno e α -humuleno. No entanto, algumas variedades de lúpulos sintetizam teores significativos de outros terpenos como farneseno, selineno, bergamoteno, entre outros, além de sesquiterpenos oxigenados (BERNOTIENĚ et al., 2004).

5.1 DETERMINAÇÃO DE TERPENOS EM LÚPULOS POR GC-MS E CLASSIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS EMPREGANDO MODELAGEM MULTIVARIADA

O estudo da composição dos terpenos do óleo essencial de lúpulo é algo amplamente discutido na literatura. Diferentes métodos de extração e cromatográficos já foram empregados para essa finalidade. O método de extração mais comumente

utilizado é a destilação por arraste de vapor, sendo a hidrodestilação seu principal representante. Via de regra, esse processo requer uma grande quantidade de material (~50 g), podendo totalizar um tempo de extração de até 4 h por amostra (SHELLIE et al., 2009). No entanto, massas menores também podem ser utilizadas em sistemas de arraste de vapor adaptados (DE COOMAN; EVERAERT; DE KEUKELEIRE, 1998).

Outros métodos para a obtenção de uma fração que contenha os terpenos são empregados, sendo eles a extração direta com solvente (STEINHAUS; SCHIEBERLE, 2000), a extração por fluido supercrítico (VAN OPSTAELE et al., 2012a; ZEKOVIĆ; PFAF-ŠOVLJANSKI; GRUJIĆ, 2007) e a extração em fase sólida usando barra magnética sortiva (KISHIMOTO et al., 2005; STEYER; CLAYEUX; LAUGEL, 2013). Além desses, ainda são encontrados trabalhos por micro extração em fase sólida usando *headspace* direto no sistema de GC-MS (sigla do inglês, HS-SPME-GC-MS) (GONÇALVES et al., 2012; JORGE; TRUGO, 2003; VAN OPSTAELE et al., 2012b).

Essa parte do trabalho tem como objetivo utilizar um método simples e rápido de extração que permita obter uma fração adequada contendo os terpenos constituintes de diferentes variedades de lúpulos comerciais com a mesma eficiência do método convencional por hidrodestilação. Os extratos foram caracterizados por GC-MS, os terpenos foram propriamente identificados e, a partir dos diferentes perfis aromáticos dos lúpulos estudados foi feita uma tentativa de classificação por abordagem multivariada.

5.1.1 Parte experimental

5.1.1.1 Reagentes e amostras

Os reagentes utilizados foram adquiridos em grau analítico. O hexano (HEX) grau GC e o sulfato de sódio foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), enquanto que o diclorometano (DCM) foi comprado junto à Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Como o DCM não apresentava pureza adequada para ser utilizado em sistema de GC-MS, o mesmo foi destilado para retirada de graxas e outras impurezas. O padrão de n-alcenos (C8-C30) foi adquirido da SigmaAldrich (St. Louis, MO, EUA), sendo esse utilizado para o cálculo do índice de retenção para auxiliar na identificação dos terpenos no lúpulo. As amostras de lúpulo foram fornecidas pela empresa Muller Empório do Malte, localizada na cidade de Juiz de Fora, MG. Trinta e duas amostras de lúpulos de diferentes variedades foram utilizadas, sendo estas listadas na Tabela 13.

5.1.1.2 Extrações

O primeiro preparo de amostras foi o processo de hidrodestilação, obtendo o óleo essencial do lúpulo como produto final. Partindo do lúpulo em pellets, obteve-se uma amostra sólida com granulometria bem fina após a pulverização com o uso de almofariz e pistilo. Cerca de um grama (1 g) dessa amostra foi pesada em um vidro de relógio e transferido para um balão de extração. A esse mesmo balão, foi adicionado uma barra magnética e 50,0 mL de água deionizada. O balão foi levado a uma manta de aquecimento com agitação magnética. O aparato para a realização da destilação foi montado apenas com conectores (juntas) de um aparato de destilação convencional. Foram usadas uma junta curva em 75° e um tubo adaptador em 105° com saída para vácuo. Ambos foram conectados e fixos com um grampo e encaixados ao balão de extração. Para recolher o hidrodestilado foi utilizada uma proveta de 50,0 mL. O sistema foi arrefecido com toalhas de papel umidificadas em banho de gelo. É importante destacar que em um procedimento convencional de destilação uma grande quantidade de amostra é requerida, muitas vezes superior a 50 g, e um longo tempo de destilação também é empregado (~3 h) (SHELLIE et al., 2009). No sistema proposto, foi usado 1 g de amostra e o processo aconteceu em torno de 50 min. Ao término da hidrodestilação, o hidrolato foi descartado e ao hidrodestilado foi adicionado 5,0 mL de hexano para o recolhimento do óleo essencial. A fase orgânica (superior) foi retirada com o auxílio de uma pipeta de pasteur e esta foi vertida em um béquer. Esse procedimento de extração líquido-líquido com hexano foi realizado em triplicata. Ao béquer foi adicionada uma porção de Na₂SO₄ para a secagem da água residual e então realizou-se a filtração novamente em balão de extração usando um filtro de papel. Esse balão foi levado ao rotaevaporador para a evaporação do solvente a 50° C. Após a evaporação do solvente a amostra de óleo essencial foi transferida para um vial de GC e lacrado com tampa de teflon. O último procedimento foi a troca de atmosfera para evitar a oxidação de compostos purgando nitrogênio diretamente sobre a amostra. Esse amostra foi estocada a 4 °C até o momento da análise.

Os outros dois sistemas para obtenção de frações contendo os terpenos do lúpulo foram realizados por meio de extrações diretas com solvente assistidos por ultrassom. Após a pulverização do lúpulo e obtenção de um pó fino, cerca de 200 mg de amostra foi transferida para um tubo de vidro com tampa de teflon, ao qual foi adicionado 1,0 mL de solvente (HEX ou DCM). Esse sistema foi levado ao banho ultrassônico por 1 h

à temperatura de 25° C. Ao término, o extrato em solvente orgânico foi transferido para o vial de GC após passar por um sistema de secagem de água residual e filtração preparado em pipeta de pasteur. Esse sistema em pipeta consiste da imobilização um pequeno pedaço de algodão e sobre ele uma pequena porção de sulfato de sódio. Após o preparo, o extrato foi diretamente injetado no sistema de GC-MS.

5.1.1.3 Parâmetros instrumentais

A separação dos componentes voláteis do óleo essencial e do extrato com solvente de lúpulo foi feito em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas da marca Shimadzu (GC-MS-QP2010Plus) contendo um autoinjeter modelo AOC-5000. O equipamento foi equipado com uma coluna Rtx-5ms (5% difenil/95% polidietilsiloxano – 30 m x 0,25 mm i.d. – 0,25 µm de espessura), trabalhando com o injetor no modo split, usando hélio como gás de arraste com fluxo na coluna de 1,0 mL min⁻¹. Para todas as análises foi injetado 1 µL de amostra no modo split com razão 1/10. A temperatura do injetor foi mantida em 200 °C. A programação do forno iniciou a 50 °C (mantendo por 5 minutos) e a programação de temperatura foi feita aquecendo o forno a uma taxa de 4,0 °C min⁻¹ até atingir a temperatura de 200 °C, esta que foi mantida por 9 minutos; totalizou uma corrida cromatográfica de 47,50 minutos. O espectrômetro de massas é equipado com uma fonte de impacto de elétrons operando a 70 eV e a faixa de massas foi avaliada de 40 a 700 m/z. As temperaturas da fonte de íons e da interface foram ajustadas em 200 °C e 220 °C, respectivamente. O tempo de corte do solvente foi ajustado em 5 minutos. Em um primeiro momento, todos os picos passíveis de integração foram levados em consideração e integrados manualmente para uma análise qualitativa. Uma vez feita a identificação dos terpenos, o tempo de retenção dos analitos foi levado em consideração para o trabalho com novas amostras.

A identificação dos compostos foi baseada no tempo de retenção, na comparação de seus espectros de massa com as bibliotecas NIST08 e NIST08s disponíveis no equipamento de GC-MS, no cálculo do índice de retenção (IR) e também pela comparação do perfil de terpenos para lúpulos de acordo com referências bibliográficas disponíveis na literatura. Não foi calculado o índice de Kovats (IK) (KOVÁTS, 1958) por conta do uso de um programa de temperatura, sendo que o IK é calculado para isotermas. Sendo assim a equação de Van den Dool e Kratz foi utilizada (VAN DEN DOOL; KRATZ, 1963). Para o cálculo do IR, inicialmente foi injetada uma mistura de

padrão de hidrocarbonetos (C8-C30), identificados os picos e anotados os tempos de retenção dos n-alcenos. Tendo essas informações, juntamente com os tempos de retenção dos analitos no cromatograma da amostra, o cálculo do IR foi baseado na equação 4

$$IR = 100n + \left(\frac{t_r^i - t_r^n}{t_r^{n+1} - t_r^n} + n \right) \times 100 \quad (4)$$

onde, IR refere-se ao índice de retenção, t_r^i diz respeito ao tempo de retenção do composto de interesse no cromatograma da amostra, t_r^n é o tempo de retenção do hidrocarboneto na mistura de n-alcenos que precede o tempo de retenção do composto de interesse, t_r^{n+1} é o tempo de retenção do hidrocarboneto na mistura de n-alcenos posterior ao tempo de retenção do composto de interesse e n é o número de carbonos do hidrocarboneto que precede o composto de interesse. De posse desse valor é possível comparar com dados da literatura dispostos em artigos e, principalmente, com bancos de dados disponíveis na literatura (ADAMS, 2007), para juntamente com os espectros de massa e com o percentual de similaridade fornecido pela biblioteca de espectros inferir sobre o composto de interesse.

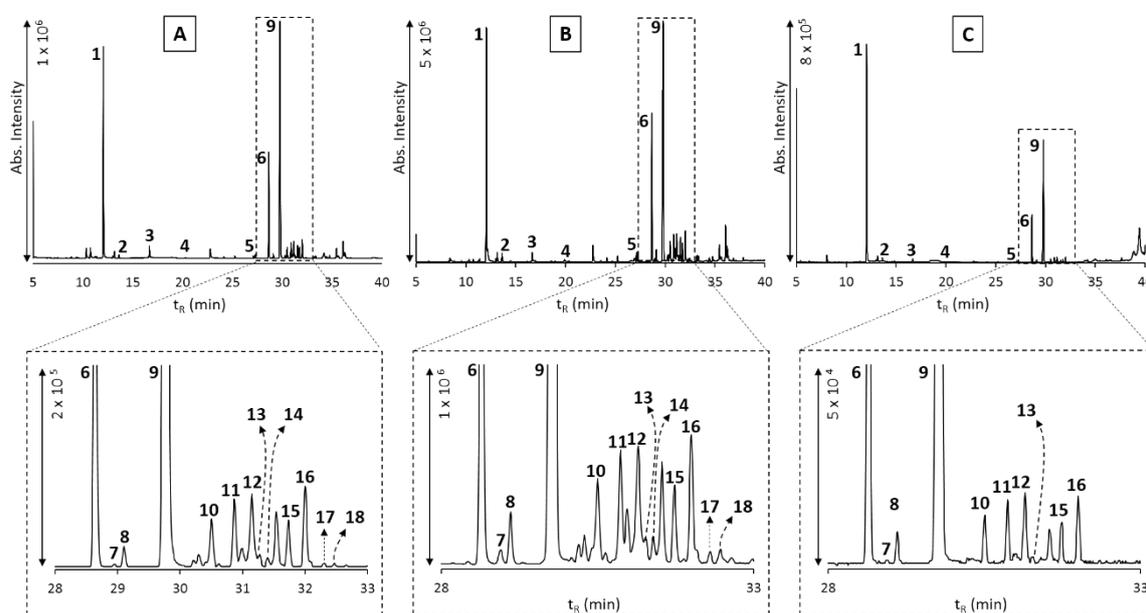
5.1.2 Resultados e discussões

5.1.2.1 Comparação dos métodos de extração

Com o objetivo de avaliar a performance dos métodos para a obtenção de uma fração que contivesse os terpenos do lúpulo, os principais resultados entre as abordagens foram comparados. A hidrodestilação leva a obtenção do óleo essencial, esse que se trata de uma fração mais limpa, o que gera um cromatograma com linha base estável ao longo de toda corrida cromatográfica, sem ruído, de fácil identificação e integração dos picos. O cromatograma característico para o óleo essencial do lúpulo após a preparação de uma amostra através da diluição com HEX na concentração de 1 mg mL^{-1} é mostrado na Figura 18 A. Para as extrações com solvente assistidas por ultrassom, um perfil cromatográfico (Figura 18 B e C, HEX e DCM, respectivamente) muito semelhante é obtido para a região em que os monoterpenos e sesquiterpenos são identificados (até 35 minutos). Após 40 minutos, outros picos que não apareciam no cromatograma do óleo essencial começam a ser identificados, sendo esses compostos de

mais elevado peso molecular como graxas que foram extraídos pelo solvente apolar, mas que não são de interesse para caracterização do perfil aromático dos lúpulos.

Figura 18: Cromatogramas obtidos por GC-MS para um óleo essencial (A), para um extrato em HEX (B) e para um extrato em DCM (C). Identificação dos compostos – 1: β -Miraceno; 2: Limoneno; 3: Linalol; 4: Geraniol; 5: α -Copaeno; 6: β -Cariofileno; 7: β -Cubebeno; 8: α -Bergamoteno; 9: α -Humuleno; 10: γ -Muroloeno; 11: β -Selineno; 12: α -Selineno; 13: α -Muuroloeno; 14: α -Farneseno; 15: γ -Cadineno; 16: δ -Cadineno; 17: Eremofileno; 18: Eudesma-3,7(11)-dieno



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Os picos foram identificados a partir da sequência de passos discutida na seção anterior. Inicialmente partiu-se do percentual de similaridade apontado pela biblioteca espectral NIST, mas o cálculo do IR à partir da injeção da mistura de hidrocarbonetos e avaliação com a literatura também foi feita. Em linhas gerais, dezoito terpenos foram identificados no óleo essencial e na extração com HEX, sendo 4 monoterpenos e 14 sesquiterpenos. Os cromatogramas, com aproximações na região mais complexa entre 27 e 33 minutos evidenciam os picos referentes aos terpenos. Os outros picos que não foram identificados, se referem a outras classes de compostos, como hidrocarbonetos não derivados do isopreno e a ésteres, por exemplo. Para a extração com DCM, 12 terpenos foram identificados. Na Tabela 12 são mostrados todos os terpenos

identificados pelas três abordagens, bem como seus respectivos tempos de retenção, concentrações, IR calculado e o fornecido pela literatura para cada um deles (ADAMS, 2007), os percentuais de similaridade fornecidos pelas bibliotecas e as fórmulas moleculares (FMO).

Considerando as três abordagens de extração, foram facilmente identificados os principais terpenos (β -mirceno, β -cariofileno e α -humuleno) que constituem cerca de 80% de toda composição, como pode ser visto nos cromatogramas da Figura 18. No entanto, as concentrações deles para o extrato em DCM foram consideravelmente diferentes quando comparado com os resultados do óleo essencial e do extrato em HEX. Os resultados por extração com DCM apresentam um maior teor de β -mirceno (46,90% - pico 1) quando comparado com α -humuleno (36,33% - Pico 9). Além disso, os picos referentes ao geraniol (pico 4), β -Cubebeno (pico 7), α -Muuroleno (pico 13), α -Farneseno (pico 14), Eremofileno (pico 17) e Eudesma-3,7(11)-diene (pico 18) não puderam ser integrados por esses compostos estarem em nível muito baixo ou por não terem sido extraídos. Os composto γ -Muuroleno (pico 10) e α -Selineno (pico 12), previamente identificados pelas outras extrações, foram identificados como sesquiterpenos, mas não foram atribuídos seguramente por conta de uma baixa similaridade fornecida pela biblioteca.

A identificação dos terpenos no óleo essencial e no extrato com HEX foi muito semelhante. Os compostos identificados foram encontrados em tempos de retenção muito próximos em ambas abordagens, o que pode ser visto pela proximidade dos IR calculados. Além disso, as concentrações para os três terpenos majoritários foram muito semelhantes: 28,68% e 25,05% (β -mirceno), 14,45% e 15,22% (β -cariofileno), 42,20% e 41,42% (α -humuleno) para o óleo essencial e extração com HEX, respectivamente.

Outro ponto a ser destacado na Tabela 12 é que o valor de IR calculado para todos os terpenos identificados foram muito próximos aos tabelados, apresentando erros relativos da ordem de 1%, com exceção do β -cubebeno que apresentou 3,8% de erro relativo. Comparando os percentuais de similaridade na Tabela 12, para os três principais compostos os valores foram elevados (acima de 95%), evidenciando a maior facilidade e segurança na identificação dos compostos majoritários. Para os demais compostos, além do percentual de similaridade e do cálculo do IR, a sequência de eluição dos compostos foi comparada com trabalhos disponíveis na literatura (GONÇALVES et al., 2012; LIGOR et al., 2014; MONGELLI et al., 2016).

Após essa avaliação, decidiu-se trabalhar com a extração hexânica para as demais 32 amostras, visto que: i) obtinha-se um perfil cromatográfico muito semelhante ao obtido pelo óleo essencial; ii) na região de identificação dos terpenos não eram encontrados picos interferentes que dificultasse a identificação e integração dos analitos de interesse; iii) os percentuais de similaridade, de acordo com a Tabela 12, foram mais elevados para o extrato em HEX; iv) utilizava-se apenas 200 mg de amostra e somente 1 mL de HEX; v) obtinha-se um aumento substancial da frequência analítica, visto que com a hidrodestilação foi preparada uma amostra em 1 h, enquanto que na extração com solvente assistida por ultrassom, todas as 32 amostras foram preparadas em 1 h.

Tabela 12: Comparação dos métodos de extração por hidrodestilação, extração com HEX e extração com DCM para obtenção da composição dos terpenos no lúpulo.

Pico n°	Extração	t _r ^a / min	Concentração %	IR _{calc} ^b	IR _{lit} ^c	Similaridade % ^d	Terpeno	FMO ^e
1	Hidrodestilação	12,05	28,68	994		96	β-Mirceno	C ₁₀ H ₁₆
	Ext HEX	12,06	25,05	995	988	95		
	Ext DCM	12,06	46,90	994		97		
2	Hidrodestilação	13,63	0,44	1032		80	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆
	Ext HEX	13,63	0,78	1032	1024	90		
	Ext DCM	13,63	0,72	1032		82		
3	Hidrodestilação	16,67	1,57	1104		90	Linalol	C ₁₀ H ₁₈ O
	Ext HEX	16,66	0,84	1104	1095	97		
	Ext DCM	16,68	0,58	1105		76		
4	Hidrodestilação	22,77	1,24	1262		90	Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O
	Ext HEX	22,74	2,10	1261	1249	96		
	Ext DCM	-	-	-		-		
5	Hidrodestilação	27,12	0,34	1385		73	α-Copaeno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext HEX	27,12	0,80	1385	1374	93		
	Ext DCM	27,13	0,25	1385		67		
6	Hidrodestilação	28,64	14,45	1431		95	β-Cariofileno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext HEX	28,65	15,22	1431	1417	96		
	Ext DCM	28,64	10,91	1431		95		
7	Hidrodestilação	28,95	0,08	1440		-	β-Cubebeno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext HEX	28,95	0,34	1440	1387	90		
	Ext DCM	-	-	-		-		
8	Hidrodestilação	29,10	0,65	1445		83	α-Bergamoteno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext HEX	29,11	1,07	1445	1432	95		
	Ext DCM	29,11	0,37	1445		76		
9	Hidrodestilação	29,79	42,20	1466		95	α-Humuleno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext HEX	29,81	41,41	1467	1452	95		
	Ext DCM	29,78	36,33	1466		95		

^a t_r - tempo de retenção | ^b IR_{calc} - Índice de retenção calculado (equação 4) | ^c IR_{lit} - Índice de Retenção da literatura (ADAMS 2007) | ^d Percentual de similaridade dos espectros de massa de acordo com as bibliotecas NIST | ^e FM - Fórmula Molecular – ELABORADA PELO AUTOR

Tabela 12: Continuação

Pico n°	Extração	t _r ^a / min	Concentração %	IK _{calc} ^b	IK _{lit} ^c	Similaridade % ^d	Terpeno	FM ^e
10	Hidrodestilação	30,51	1,51	1488		89		
	Ext HEX	30,50	2,26	1488	1478	92	γ-Muroleno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext DCM	30,50	0,73	1488		-		
11	Hidrodestilação	30,87	2,06	1499		93		
	Ext HEX	30,87	2,14	1499	1489	93	β-Selineno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext DCM	30,87	0,84	1499		75		
12	Hidrodestilação	31,15	2,09	1508		90		
	Ext HEX	31,15	2,63	1508	1498	91	α-Selineno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext DCM	31,15	1,00	1508		-		
13	Hidrodestilação	31,27	0,21	1512		75		
	Ext HEX	31,27	0,12	1512	1500	90	α-Muuroleno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext DCM	-	-	-		-		
14	Hidrodestilação	31,41	0,24	1516		80		
	Ext HEX	31,39	0,38	1516	1505	93	α-Farneseno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext DCM	-	-	-		-		
15	Hidrodestilação	31,735	1,46	1527		90		
	Ext HEX	31,731	1,75	1527	1513	90	γ-Cadineno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext DCM	31,738	-	1527		75		
16	Hidrodestilação	32,003	2,56	1536		89		
	Ext HEX	31,998	2,68	1536	1522	89	δ-Cadineno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext DCM	32,001	-	1536		75		
17	Hidrodestilação	32,308	0,11	1546		-		
	Ext HEX	32,301	0,2	1546	1512	91	Eremofileno	C ₁₅ H ₂₄
	Ext DCM	-	-	-		-		
18	Hidrodestilação	32,47	0,11	1551		-		
	Ext HEX	32,465	0,22	1551	1535-1542	91	Eudesma-3,7(11)-diene	C ₁₅ H ₂₄
	Ext DCM	-	-	-		-		

^a t_r - tempo de retenção | ^b IR_{calc} - Índice de retenção calculado (equação 4) | ^c IR_{lit} - Índice de Retenção da literatura (ADAMS 2007) | ^d Percentual de similaridade dos espectros de massa de acordo com as bibliotecas NIST | ^e FM - Fórmula Molecular – ELABORADA PELO PRÓPRIO AUTOR

5.1.2.2 Comparação dos perfis aromáticos de lúpulos de diferentes variedades

Após a realização das extrações hexânicas assistidas por ultrassom, as amostras foram injetadas sequencialmente no sistema de GC-MS utilizando o autoinjeter. Os resultados da composição terpênica dos extratos hexânicos de diferentes variedades de lúpulos são mostrados na Tabela 13. Como esperado, os compostos majoritários em todas as amostras são o β -mirceno (1), β -cariofileno (6) e α -humuleno (9). Além desses, o linalol (3), geraniol (4), α -copaeno (5), β -cubebeno (7), γ -Muroloeno (10), β -Selineno (11), α -Selineno (12), α -Muroloeno (13), γ -Cadineno (15) e δ -Cadineno (16) foram identificados em todas amostras. Em contrapartida, o α -Bergamoteno (8) e o α -Farneseno (14) foram encontrados em um número menor de amostras. Além dos 18 terpenos identificados tanto no óleo essencial quanto no teste de extração com HEX discutido na seção anterior, o Alloaromadendreno (tempo de retenção ~ 29,15 min) foi identificado em algumas variedades com característica aromática como o lúpulo Fuggle (2,48% e 4,02% nas duas amostras do conjunto), o lúpulo Mittelfruher (0,36%) e o lúpulo Hersbrucker (4,22%).

Como foram identificados 18 metabólitos, realizar uma análise univariada a fim de tentar classificar os lúpulos se torna uma tarefa difícil. Nesse sentido, uma abordagem multivariada foi proposta na tentativa de reconhecer padrões dentro das variedades de lúpulos estudadas a partir de seus perfis aromáticos. Para tanto uma PCA foi realizada. A matriz \mathbf{X} para construção do modelo multivariado foi formada a partir das concentrações obtidas pelo GC-MS disponíveis na Tabela 12. Tomou-se como variáveis para a modelagem somente os terpenos que foram identificados em todas as amostras (1, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15 e 16). Logo, a matriz formada apresentou a dimensão \mathbf{X} (32x13), sendo 32 amostras e 13 variáveis. Os dados foram centrados na média antes da modelagem quimiométrica.

Tabela 13: Composição terpênica de lúpulos de diferentes variedades por GC-MS

	% α A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	**
Amarillo (1)	12,6	39,5	0,98	0,77	0,62	0,7	17,2	0,46	-	25,9	2,22	3,26	3,73	0,22	-	1,44	2,3	0,45	0,34	-
Fuggle (2)	5,0	10,8	0,82	3,54	0,55	0,54	9,97	0,32	1,97	36,9	2,71	5,64	6,6	0,48	0,29	1,28	2,99	6,22	5,94	2,48
Target (3)	9,0	5,5	0,59	1,9	0,52	2	17,3	1,32	-	36,6	5,41	2,91	2,25	1,47	-	5,83	8,01	3,14	5,26	-
Saaz (4)	3,5	13,1	0,57	1,28	0,47	0,45	11,7	0,38	2,15	62,7	1,35	0,3	0,44	0,26	0,2	1,68	2,53	0,21	0,24	-
Cascade (5)	6,1	21,8	0,49	0,73	2,41	0,75	13,6	0,31	0,91	43,2	2,08	3,82	4,27	0,36	0,53	1,68	2,62	0,29	0,15	-
Amarillo (6)	5,5	23,3	0,46	1,35	1,06	0,62	14,9	0,58	0,98	47,3	1,73	0,43	0,44	0,59	0,48	2,05	3,28	0,34	0,11	-
Mozaic (7)	12,0	45,3	1,33	1,34	2,19	0,65	13,7	0,61	-	27,4	1,3	0,78	0,26	0,26	0,52	1,48	2,41	0,3	0,26	-
Mittrlfruh (8)	4,8	11,2	0,42	1,55	0,22	0,88	19	1	-	49,1	2,49	1,45	1,59	0,83	0,19	2,96	4,5	1,24	1,04	0,36
El dorado (9)	10,5	31,6	0,58	1,11	2,16	1,08	17,4	0,97	-	22,5	3,02	4,03	4,6	0,74	0,34	2,83	4,5	1,49	1,07	-
Er Golding (10)	5,4	14,1	0,42	0,83	0,2	0,8	20,2	1,15	-	51,6	2,02	0,8	0,65	0,48	0,11	2,37	3,67	0,44	0,19	-
Northern Brewer (11)	10,4	27,9	0,94	0,74	0,27	0,98	19	0,97	-	37,8	2,07	0,88	0,41	0,64	0,18	2,49	3,97	0,45	0,4	-
Hersbrucker (12)	2,5	4,86	-	1,09	0,14	0,55	15,3	0,7	-	36,5	2,92	6,98	7,93	0,37	-	1,43	3,3	7,53	6,24	4,22
Magnum (13)	14,9	29	0,85	0,76	0,53	0,73	17,1	1,26	-	39,2	1,79	0,77	0,79	0,29	1,18	1,86	3,22	0,4	0,35	-
Columbus (14)	16,3	29,8	0,79	0,99	3,4	1,87	15,6	1,16	-	21,1	3,78	2,47	2,9	1,03	-	3,83	5,77	3,04	2,52	-
Citra (15)	13,7	44,3	0,95	2,09	0,68	0,48	15,8	0,39	-	22,7	1,27	3,08	2,81	0,22	1,41	1,27	2,06	0,19	0,24	-
Nugget (16)	12,0	33,8	0,88	1,9	0,16	0,79	18,2	0,63	-	31	1,73	2,65	2,49	0,33	0,33	1,69	2,78	0,37	0,37	-
Columbus (17)	14,9	31,7	0,75	1,1	2,56	1,5	15,4	1,75	-	20,2	3,77	2,69	2,65	1,2	-	3,92	5,77	2,94	2,18	-
Herkules (18)	14,3	21,6	1,19	0,71	0,71	1,22	17,5	0,74	-	43,6	1,97	1,07	0,95	0,63	0,23	2,48	3,99	0,8	0,7	-
Simcoe (19)	12,0	34,2	1,24	1,4	1,97	1,2	16,9	0,45	-	31,5	1,98	0,88	0,45	0,46	0,46	2,26	3,61	0,48	0,58	-
Citra (20)	12,6	3,82	0,66	5,53	2,07	1,46	21,1	0,82	-	35,3	3,79	8,78	5,87	1,01	0,54	3,28	4,14	0,62	1,21	-

1: β -Mirceno | 2: Limoneno | 3: Linalol | 4: Geraniol | 5: α -Copaeno | 6: β -Cariofileno | 7: β -Cubebeno | 8: α -Bergamoteno | 9: α -Humuleno | 10: γ -Muroleno | 11: β -Selineno | 12: α -Selineno | 13: α -Muuroleno | 14: α -Farneseno | 15: γ -Cadineno | 16: δ -Cadineno | 17: Eremofileno | 18: Eudesma-3,7(11)-diene ** Alloaromadendreno (tr ~ 29,15 min)

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Tabela 13: Continuação

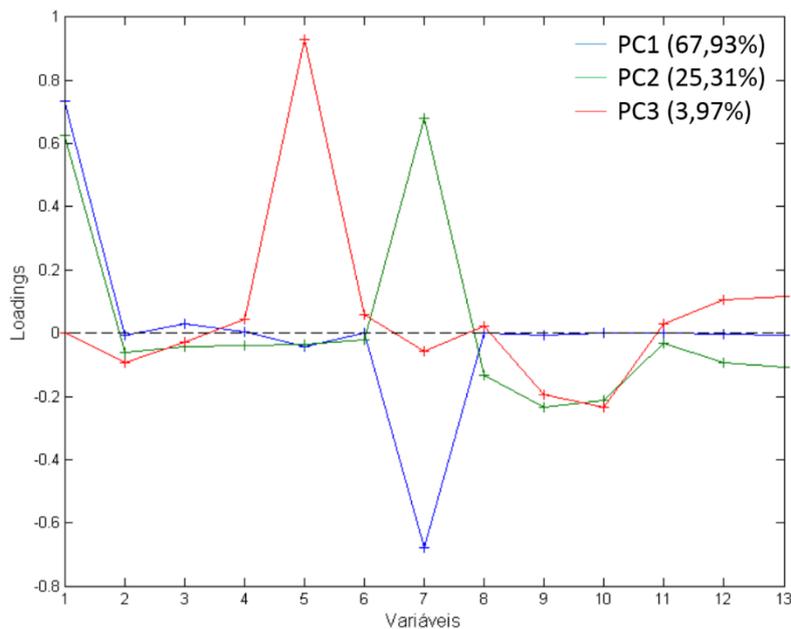
	% α A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	**
Saaz (21)	2,96	5,16	0,25	1,06	0,57	0,49	13,23	0,52	2,02	67,64	1,31	0,33	0,27	0,28	-	1,69	2,88	0,55	1,75	-
Tradition (22)	3,0	5,05	0,36	2,2	0,14	0,74	20,95	0,94	-	58,68	1,96	0,78	0,46	0,54	-	2,51	3,9	0,39	0,42	-
Chinook (23)	10,8	10,48	0,43	0,9	1,52	2,91	16,44	0,94	-	29,99	5,66	3,15	4,26	1,67	0,19	6,01	8,55	3,98	2,92	-
S. Golding (24)	4,0	2,22	0,1	2,21	0,41	1,06	18,01	0,71	0,92	39,23	4,08	11,89	10,67	0,66	-	2,97	4,05	0,56	0,25	-
Nugget (25)	10,0	7,35	0,42	1,65	0,18	0,99	25,38	0,78	-	45,7	2,36	3,53	3,55	0,67	0,48	2,39	3,62	0,53	0,43	-
Perle (26)	4,2	6,89	0,29	0,51	0,18	0,85	24,62	1,19	-	53,68	1,95	0,91	0,42	0,67	-	2,49	4,35	0,65	0,37	-
Amarillo (27)	7,1	27,74	0,64	1,54	1,76	0,83	14,08	0,55	0,95	42,79	1,81	0,31	0,48	0,51	0,34	2,07	2,91	0,33	0,34	-
Magnum (28)	12,1	8,98	0,54	0,6	0,4	1,03	22,21	1,33	-	51,43	2,4	1,02	0,9	0,47	0,89	2,63	4,32	0,58	0,27	-
Galena (29)	12,0	12,78	0,55	1,06	1,01	0,93	23,14	0,92	-	38,05	2,79	3,3	3,58	0,45	5,89	2,33	3,23	-	-	-
Fuggle (30)	4,0	3,78	1,01	4,78	1,14	0,76	11,07	0,38	2,45	31,69	3,82	8,24	7,68	0,42	-	1,9	3,76	7,06	6,04	4,02
Tettnang (31)	2,2	13,14	0,43	1,16	0,42	0,36	11,99	0,56	1,83	60,06	1,32	0,93	0,98	0,31	-	1,51	2,66	0,66	1,69	-
Columbus (32)	14,0	2,74	0,65	2,1	4,86	2,73	16,44	2,62	-	25,81	8,15	5,61	3,66	2,27	-	7,74	8,31	3,91	2,4	-

1: β -Mirceno | 2: Limoneno | 3: Linalol | 4: Geraniol | 5: α -Copaeno | 6: β -Cariofileno | 7: β -Cubebeno | 8: α -Bergamoteno | 9: α -Humuleno | 10: γ -Muroloeno | 11: β -Selineno | 12: α -Selineno | 13: α -Muuroloeno | 14: α -Farneseno | 15: γ -Cadineno | 16: δ -Cadineno | 17: Eremofileno | 18: Eudesma-3,7(11)-diene ** Alloaromadendreno (tr ~ 29,15 min)

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

O gráfico de loadings que evidencia quais variáveis cada componente principal (PC) deu mais importância é mostrado na Figura 19. Analisando essa figura é possível notar que o percentual de explicação das variáveis originais foi elevado (97,21%) e que as duas primeiras PCs dão maior peso para as variáveis 1 (β -mirceno) e 7 (α -humuleno), enquanto que a PC3 mostra a variável 5 (β -cariofileno) como a mais relevante. Por essa avaliação também é possível dizer que esses são os terpenos mais significativos presentes no lúpulo. É importante destacar que para a modelagem com a PCA somente 13 variáveis (terpenos) foram utilizadas, logo os números da codificação inicial dos compostos são diferentes dos números das variáveis de modelagem, como por exemplo o α -humuleno (terpeno de número 9) corresponde à variável 7 da modelagem e o β -cariofileno (terpeno 6) corresponde à variável 5 da modelagem.

Figura 19: Loadings da PCA considerando as três principais PCs



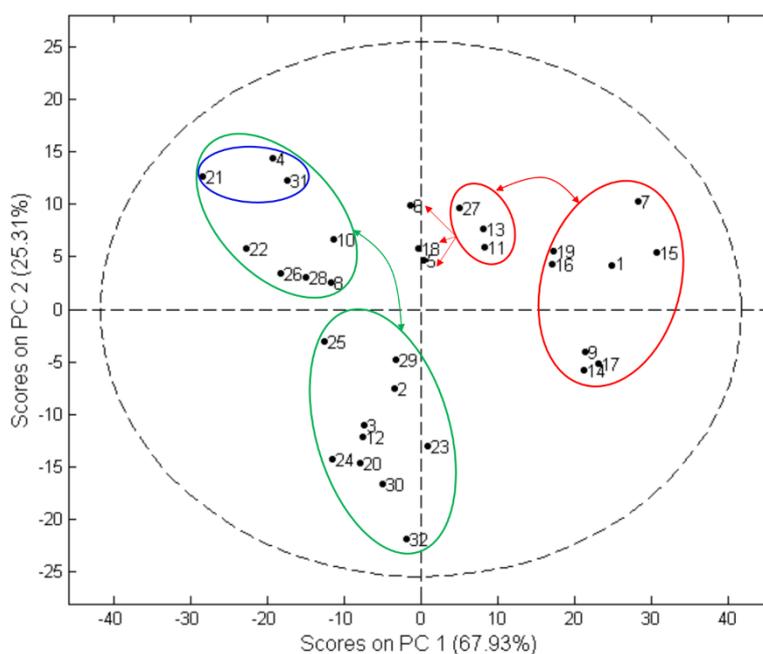
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A interpretação do gráfico biplot de scores (Figura 20) com base nas concentrações dos principais terpenos não foi simples por conta da existência de lúpulos com duplo propósito (DP), apresentando características entre lúpulos de AR e AM. Além disso, dentro da classe dos lúpulos mais aromáticos foi observado uma grande variação na concentração dos três principais constituintes.

Para auxiliar a análise do gráfico biplot de scores na identificação dos grupos e na correlação entre as amostras por conta da proximidade entre elas, uma análise de cluster baseado em PCA também foi feita, sendo o resultado mostrado na Figura 21. Além disso, a fim de tornar a análise mais quantitativa e contribuir para a justificação da posição do agrupamento das amostras nos gráficos de scores da Figura 20 e do dendograma da Figura 21, na Figura 22 são mostrados 3 gráficos contendo as concentrações dos três principais terpenos, bem como a razão entre α -humuleno/ β -mirceno e α -humuleno/ β -cariofileno.

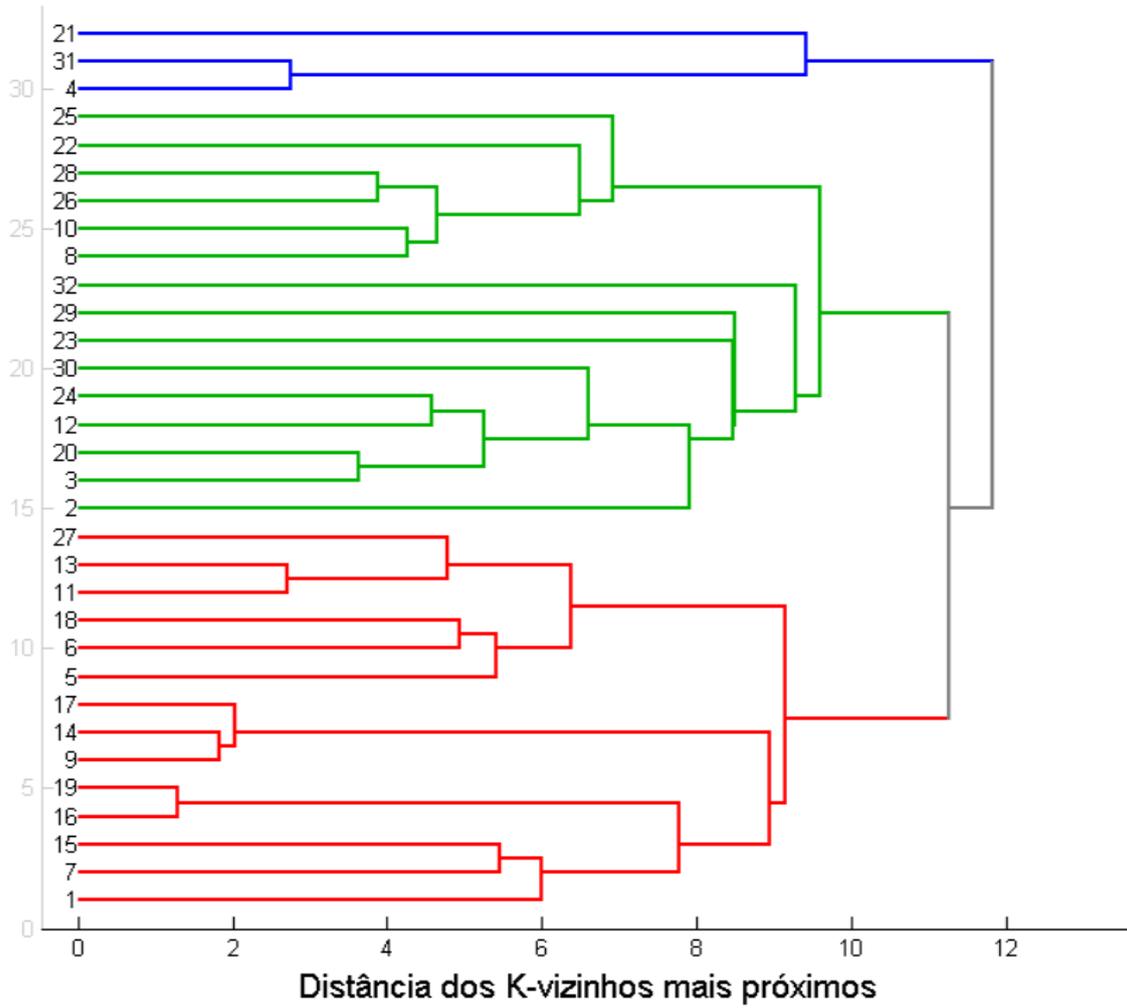
A correlação entre o grupo destacado em vermelho no gráfico de scores (Figura 20) e no dendograma (Figura 21) está no gráfico A da Figura 22. Para o grupo de amostras destacado em verde e azul que se encontram nos scores positivos da PC2, (Figura 20) e compreendendo as amostras de número 21 a 18 no dendograma (Figura 21), a correlação quantitativa na Figura 22 pode ser vista no gráfico B. Para as amostras destacadas em verde na segunda elipse localizada nos scores negativos da PC2 (Figura 20) e no dendograma sendo as amostras numeradas de 32 e 2, as informações quantitativas correlatas podem ser encontradas no gráfico da Figura 22 C.

Figura 20: Gráfico biplot de scores para tentativa de reconhecimento de padrões das amostras de lúpulo a partir de seu perfil aromático.



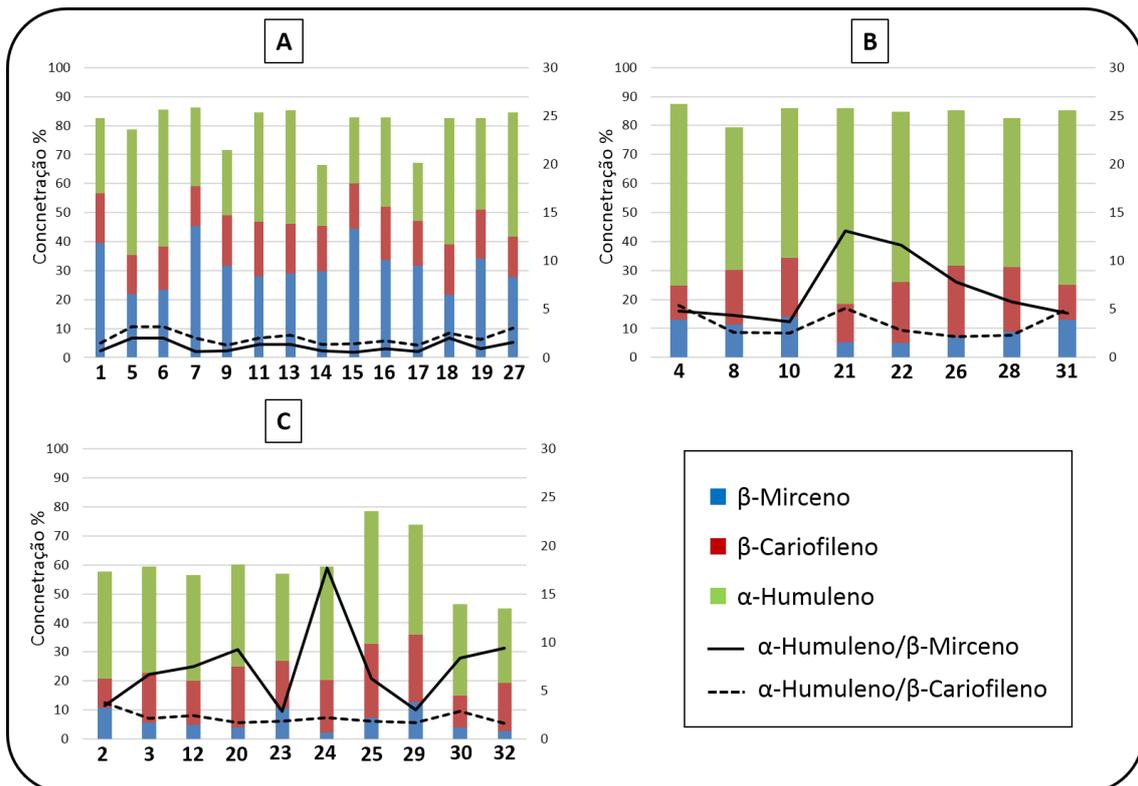
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 21: Dendrograma para análise hierárquica de cluster para auxílio na interpretação do gráfico biplot de scores da Figura 20.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 22: Concentrações de β -mirceno, β -cariofileno e α -humuleno, bem como as razões α -humuleno/ β -mirceno e α -humuleno/ β -cariofileno, para todas as amostras analisadas. Amostras destacadas em vermelho nas Figura 20 e 21 foram agrupadas no gráfico de barras (A); amostras destacadas em verde localizados nos scores positivos da PC2 (Figura 20) foram agrupadas no gráfico (B). As demais amostras, também destacadas em verde e localizadas nos scores negativos da PC2, tem sua correlação quantitativa mostrada no gráfico C.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

De maneira geral, apesar da PC1 e PC2 atribuírem os terpenos β -mirceno e α -humuleno como as variáveis mais significativas, elas contribuíram para a separação dos conjuntos de maneiras distintas. A PC1, explicando 67,93% das variáveis originais permitiu a separação dos conjuntos de lúpulos de amargor e aroma levando em consideração basicamente os três terpenos majoritários, visto que no gráfico de loadings o PC1 praticamente não considerou os demais terpenos.

Por outro lado, a PC2 teve o papel de permitir a separação de amostras de lúpulo com uma maior variabilidade na composição dos terpenos, uma vez que o gráfico de loadings mostra que a PC2, além de conferir importância significativa aos três terpenos

majoritários, ela conferiu importância às demais variáveis, sendo os terpenos β -Selineno, α -Selineno e α -Muuroleno atribuídos às variáveis 8, 9 e 10 da matriz **X**. Essa separação da PC2 com base na maior variabilidade de composição terpênic dos lúpulos pode ser vista claramente avaliando os gráficos da Figura 22. No gráfico A, as amostras 9, 14 e 17 apresentam os mais baixos teores dos três terpenos majoritários quando comparados com as demais amostras e por isso se situam nos scores negativos da PC2. Essas mesmas amostras podem ser vistas agrupadas no dendograma da Figura 21. É ainda mais nítido quando o gráfico B da Figura 22 é observado, onde é possível notar que a concentração somada dos três terpenos majoritários não ultrapassa 60% para a maioria das amostras, o que permite dizer que a composição terpênic é mais distribuída para essas amostras de lúpulo.

Considerando a discussão para a tentativa de identificação de padrão do comportamento das amostras de lúpulo no que diz respeito às características de AR, AM e DP, a separação feita pela PC1 e uma avaliação mais minuciosa dentro da elipse destacada precisa ser feita. As amostras agrupadas no conjunto destacado pela maior elipse vermelha no gráfico de scores (Figura 20 – amostras: 1, 7, 9, 14, 15, 16, 17 e 19) são consideradas como lúpulos com características de amargor devido ao seu mais elevado teor de α -ácidos (Tabela 12 – 12,6%; 12,0%; 10,5%; 16,3%; 13,7%; 12,0%; 14,9% e 12,0%). Esse agrupamento também é visto no dendograma da Figura 21. É interessante que esse mesmo padrão é identificado pela avaliação dos teores dos principais terpenos e pelas relações entre eles. Na Figura 22 A é possível perceber que para as amostras citadas há uma maior produção do metabólito β -mirceno (barra azul) quando comparado com o α -humuleno (barra verde). Isso faz com que a relação α -humuleno/ β -mirceno seja característica para esse grupo, onde valores mais baixos (em torno de 1,0) são obtidos (linha preta cheia). Essa maior produção de β -mirceno para lúpulos com característica de amargor é discutida na literatura (LEONARDI et al., 2013). Citando alguns representantes marcantes dessa classe, pode-se destacar o Mosaic (7) e o Citra (15), estes que apresentam elevado teor de α -ácido (12,0% e 13,7%) e elevado teor de β -mirceno (45,31% e 44,32%).

Os lúpulos Northern Brewer (11), Magnum (13) e Amarillo (27) também foram classificados pela PC1 próximos ao grupo delineado pela elipse preta devido ao considerável teor de β -mirceno, mas eles ficaram um pouco mais afastados por conta do aumento do teor de α -humuleno em sua composição. Essa característica é evidenciada

quando o gráfico A da Figura 22 é avaliado, visto que é possível perceber para essas amostras (11, 13 e 27) que a barra verde é maior que a barra azul, o que faz a linha preta que diz respeito a razão α -humuleno/ β -mirceno ser superior a 1. Esse nível um pouco mais elevado de α -humuleno faz com que esses lúpulos tenham uma característica de DP, como também colocado por Leonardi et al. (2013) para o lúpulo Northern Brewer. Ainda mais à esquerda do principal conjunto, mas também correlacionado com o conjunto destacado em vermelho pelo gráfico de scores (Figura 20) e pelo dendograma (Figura 21), são posicionadas as amostras 5 (Cascade, α -ácido 6,1%), 6 (Amarillo, α -ácido 5,5%) e 18 (Herkules, α -ácido 5,5%), sendo que apesar dos lúpulos Cascade e Amarillo apresentarem uma menor % de α -ácido que o lúpulo Herkules, a relação para os três foi semelhante e próximo a 2,0 (Figura 22).

Um conjunto de lúpulos mais aromáticos foi identificado, sendo delineados pela elipse verde e localizados nos scores positivos da PC2 (Figura 20 – amostras 4, 8, 10, 21, 22, 26, e 31), estes que apresentam um percentual de α -ácidos mais baixo (3,5%, 4,8%, 5,4%, 2,96%, 3,0%, 4,2% e 2,2%, respectivamente). No gráfico da Figura 22 B é mostrado que o percentual de α -humuleno é consideravelmente superior ao de β -mirceno, o que faz a razão α -humuleno/ β -mirceno ser muito superior a 1, alcançando os valores de 13,11 e 11,62 para os lúpulos Saaz e Tradition, respectivamente. Os lúpulos Saaz e Tettnang são descritos como lúpulos de aroma mais fino, devido à elevada produção de óleo essencial e por apresentarem baixo % de α -ácido (LEONARDI et al., 2013). Essa confirmação foi observada principalmente pela análise de cluster, onde foi identificada essa separação das amostras de aroma mais fino, dentro do conjunto de lúpulos aromáticos, o que pode ser confirmado no dendograma da Figura 21 e que foi destacado no gráfico de scores da PCA (Figura 20).

Os demais lúpulos destacados pela elipse verde nos scores negativos da PC2 apresentam concentração de α -humuleno superior a de β -mirceno (Figura 22 C). Seriam esses, lúpulos com característica de aroma como o Fuggle (2 e 30, α -ácido 5,0% e 4,0%, respectivamente), o Hersbrucker (12, α -ácido 2,5%), S. Golding (4, α -ácido 4,0%) e lúpulos com característica de DP, estes que apresentam um considerável teor de α -ácido (9,0%, 12,6%, 10,8%, 10,0% e 12,0%), um perfil terpênico mais diversificado e também uma maior quantidade de α -humuleno em detrimento de β -mirceno.

A composição do óleo essencial de lúpulos de mais elevado teor de α -ácidos, como para o caso do Magnum e do Columbus, pode ser muito variável, o que contribui

para a explicação de um provável *outlier* estatístico que seria o Magnum (28), em vista de sua alocação juntamente com os demais lúpulos aromáticos (elipse verde – Figura 20). O Columbus (32 – α -ácido 14,0%) também ficou distante dos outros dois lúpulos Columbus (14 e 17 – α -ácido 14,9% e 16,3%, respectivamente). O Columbus (32) apresentou um teor agregado para os três principais terpenos muito inferior (menor que 50%) quando comparado aos demais óleos, sendo sua composição mais variável em que níveis de maior concentração de γ -Muroleno (8,15%) e δ -Cadineno (8,31%) foram encontrados em comparação com as demais amostras.

A razão α -humuleno/ β -cariofileno também é discutida na literatura como um parâmetro interessante para identificação de padrão de lúpulos AR, AM e DP. Em geral, a razão α -humuleno/ β -cariofileno é maior para lúpulos mais aromáticos como é caso dos lúpulos do gráfico B (Figura 21), em que a linha pontilhada mostra valores em média mais elevados (3,50) que os apresentados no gráfico A (1,80) (Figura 21). Os lúpulos do gráfico C (Figura 21) apresentaram valores em média de 2,35.

5.1.3 Conclusão

Nessa parte do trabalho foi feita a caracterização do perfil terpênico/aromático de diferentes variedades de lúpulos comerciais a fim de tentar reconhecer padrões utilizando as informações geradas por GC-MS com auxílio de abordagens multivariadas. Como se tratava de um número considerável de amostras, foi proposto um método de preparo de amostras por extração direta com solvente assistido por ultrassom, o qual apresentou resultados do perfil terpênico similares quando comparado com o método convencional por hidrodestilação para obtenção do óleo essencial. Isso resultou em um aumento considerável da frequência analítica sem perda na eficiência da resposta procurada. Com o objetivo de comparar muitas variáveis de uma só vez, lançou-se mão de uma abordagem multivariada pela aplicação de PCA e análise de cluster. Utilizando as concentrações de 13 terpenos identificados por GC-MS em todas as amostras de lúpulo, pôde-se classificar lúpulos com características de amargor e lúpulos com características de aroma a partir de seus perfis terpênicos com o auxílio de ferramentas de análise multivariada. Essa é uma abordagem indireta para classificação da característica de lúpulos, no entanto o reconhecimento de padrões a partir do perfil terpênico não é uma tarefa simples uma vez que algumas amostras com duplo propósito

(de aroma e amargor) podem confundir a classificação, além de algumas amostras com elevado teor de α -ácido apresentarem variações em seus perfis de óleo essencial.

6 ÁCIDOS GRAXOS

AG desempenham importantes funções para as células lipídicas, sendo essenciais para a função das membranas. AG são necessários para o crescimento e desenvolvimento da planta (LI et al., 2016). AG são sintetizados em plantas a partir do triacilglicerol, o qual se torna substrato para lipases. Considerando a maioria das plantas, o glicerolípídeos estruturais contém predominantemente os ácidos oleico (C18:1-cis-9), linoleico (C18:2-cis-9,12), linolênico (C18:3-cis-6,9,12) e palmítico (C16:0). No entanto, vários outros AG podem ocorrer em plantas (SCHIMID; OHLROGGE, 2002). O conhecimento da composição de AG do lúpulo é muito importante do ponto de vista botânico, fitoquímico e também para a indústria cervejeira, em decorrência de suas atividades benéficas e maléficas no processo de produção de cervejas.

No processo de produção da cerveja, os AG podem desempenhar diferentes papéis, tais como: afetar o metabolismo da levedura na etapa de fermentação; gerar sabores indesejáveis na cerveja (chamados de *off-flavors*), devido a possível oxidação de ácidos graxos insaturados, principalmente C18:2(cis-9,12) e C18:3(cis-6,9,12), isso pode resultar em sabor de envelhecimento; os ácidos graxos saturados podem desestabilizar a espuma da cerveja por apresentarem uma cadeia mais hidrofóbica e tenderem a absorver gases apolares da atmosfera. Além disso, a razão entre os teores de AG insaturados (supressores) e saturados (promotores) está relacionada com uma inconveniência conhecida como *gushing*, onde ocorre o extravasamento repentino da espuma ao se abrir o recipiente contendo o produto (BRAVI et al., 2017; HOR et al., 2009).

6.1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS NO LÚPULO POR GC-FID

Poucos trabalhos considerando o estudo do perfil lipídico do lúpulo são encontrados na literatura. A fim de estudar o efeito de *gushing* na cerveja, Carrington et al. (1972) determinou a composição dos AG no lúpulo. Os pesquisadores propuseram como preparo de amostras uma extração direta com hexano e após alguns outros processamentos da amostra, como por exemplo uma etapa de isomerização dos α -ácidos, a esterificação foi realizada utilizando MeOH-BF₃. Os metil ésteres de AG (sigla do inglês, FAMES) foram separados, identificados e quantificados por GC. Sendo assim, C16:0, C18:0 (ácido esteárico), C18:1(cis-9), C18:2(cis-9,12) e C18:3(cis-6,9,12). Sandra et al. (1973) propuseram uma etapa prévia de preparo de amostras envolvendo a fervura do lúpulo durante 2 h para remoção dos α -ácidos. A extração foi realizada utilizando clorofórmio. Após a evaporação do solvente, o extrato resultante foi resuspenso em clorofórmio contendo n-octacosano (C28) como padrão interno e então analisado no GC. Além dos mesmos cinco AG identificados como descrito no trabalho de Carrington, os ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmitoleico (C16:1-cis9) foram determinados. Kavanagh et al. (1975) trabalharam com óleo de semente de lúpulo, o qual inicialmente avaliaram por cromatografia em camada delgada. As frações neutra e ácida foram submetidas à esterificação pelas reações com hidróxido de KOH/MeOH e BF₃/MeOH, respectivamente. Além dos AG já mencionados anteriormente, eles encontraram o ácido araquídico (C20:0). Demireva e Totoya (1995) identificaram dez FAMES de AG por GC, os mesmos mencionados anteriormente. A extração lipídica foi feita utilizando uma mistura ternária MeOH/Éter de petróleo/DCM em um sistema fechado com temperatura controlada.

Nessa parte do trabalho, foi proposta uma investigação mais completa da composição dos AG do lúpulo. O preparo de amostras foi cuidadosamente avaliado. Para tanto, a extração lipídica foi avaliada por três diferentes métodos e o processo de esterificação investigado pelo emprego de reações de transesterificação por catálise ácida e catálise básica. De posse do método otimizado, trinta amostras de lúpulo, de vinte e quatro diferentes variedades foram analisadas. Considerando o levantamento bibliográfico feito, acreditamos que pela primeira vez três AG insaturados foram identificados e quantificados, sendo os ácidos: eicosanóico (C20:1-cis-11), eicosadienóico (C20:2-cis-11,14) e docosadienóico (C22:2-cis-13,16)

6.1.1 Parte experimental

6.1.1.1 Reagentes, soluções e amostras

Todos os reagentes foram obtidos em grau analítico. As soluções salinas foram preparadas com água deionizada (sistema Milli-Q; Millipore, Bedford, MA, EUA). Ácido acético, hexano, MeOH, clorofórmio, isopropanol, sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e cloreto de sódio (NaCl) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A solução de metóxido de sódio foi adquirida da Fluka (St. Louis, MO, EUA). O padrão de ésteres metílicos FAME Supelco 37 utilizado para identificação dos FAMES da amostra de lúpulo foi comprado da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Soluções de Na_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e NaCl 0,9% m/v, utilizadas para a extração lipídica, foram preparadas em água deionizada.

As amostras de lúpulo em pellets foram doadas pela empresa Muller Empório do Malte, situada no município de Juiz de Fora, Minas Gerais. Vinte e quatro diferentes variedades foram investigadas nesse estudo, sendo trinta amostras analisadas no total.

6.1.1.2 Preparo de amostras

Previamente, todas as amostras de lúpulo foram pulverizadas com o auxílio de um almofariz e pistilo de porcelana e então, todas as amostras foram submetidas a extração lipídica seguida da reação de transesterificação. Três procedimentos de extração foram avaliados: i) Hara e Radin (HARA; RADIN, 1978), que emprega a mistura hexano/isopropanol 3:2 v/v como solução extratora (SE); ii) Bligh e Dyer (BLIGH; DYER, 1959) que usa a mistura clorofórmio/MeOH 1:1 v/v como SE; iii) Folch e Stanley (JORDI FOLCH; SLOANE STANLEY, 1957), o qual usa a mistura clorofórmio/MeOH 2:1 v/v como SE. Para a transesterificação, dois tipos de reações foram avaliadas, empregando as catálises ácida e básica descritas por Christie (CHRISTIE, 1993a).

6.1.1.2.1 Extrações

O método descrito por Hara e Radin foi realizado pesando 500 mg de lúpulo pulverizado em um frasco, onde 3,75 mL de SE (hexano/isopropanol 3:2 v/v) foi adicionado, acrescido de 2,50 mL de solução de Na_2SO_4 ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) para separação de

fases. A solução obtida foi agitada em vortex durante 1 minuto com velocidade máxima, filtrada utilizando filtro de papel e então incubada em banho de gelo para auxiliar na separação das fases. A fase orgânica superior foi transferida para um outro frasco e a fase aquosa remanescente foi lavada mais duas vezes com 2,5 mL de SE. O extrato orgânico combinado foi transferido para um balão de extração previamente pesado e então levado ao evaporador rotativo, operando sob pressão reduzida e à 40 °C, para evaporação do solvente. O processo de evaporação ocorreu até que somente a fração lipídica fosse observada. O balão foi novamente pesado para que a massa da fração lipídica extraída fosse obtida.

A extração lipídica por Bligh e Dyer foi realizada empregando 500 mg de amostra previamente pulverizada em um frasco e adicionando 4,0 mL de SE (clorofórmio/MeOH 1:1 v/v). Essa mistura foi agitada em vortex durante 1 minuto com máxima velocidade e então filtrada com papel de filtro para outro frasco. Foi então adicionada 1,0 mL de água deionizada e a mistura foi incubada em banho de gelo para auxiliar na separação de fases. A fase superior foi descartada e a fase inferior foi coletada em um balão de extração previamente pesado. Esse balão foi levado ao evaporador rotativo operando sob pressão reduzida e à 40 °C até que somente a fração lipídica fosse obtida. Por fim, o balão foi novamente pesado para obtenção da massa referente a fração lipídica.

O procedimento de extração feito pelo método de Folch e Stanley também foi realizado pesando 500 mg de lúpulo pulverizado em um frasco e adicionando 10,0 mL de SE (clorofórmio/MeOH 2:1 v/v). A mistura obtida foi levada ao vortex para agitação durante 1 minuto com velocidade máxima e filtrada utilizando filtro de papel para um novo frasco. Foi então adicionada 2,0 mL de uma solução NaCl 0,9% m/v e essa mistura foi novamente submetida a agitação em vortex, agora durante 30 segundos. O frasco foi incubado em banho de gelo para auxiliar na separação das fases. A fase superior foi descartada e a inferior foi coletada em um balão de extração previamente pesado. O balão foi levado ao evaporador rotativo operando sob pressão reduzida e à 40° C até que somente a fração lipídica fosse obtida. O balão foi pesado para a obtenção da massa referente a fração lipídica extraída.

6.1.1.2.2 Reações de transesterificação

Para realizar a reação de transesterificação via catálise básica (RTCB), 2,0 mL de uma solução de metóxido de sódio em metanol foi adicionado ao balão de extração

contendo a fração lipídica de massa conhecida obtida na etapa de extração. Esse balão foi imediatamente levado ao aquecimento em banho térmico com temperatura controlada a 50 °C, sob refluxo com hastes de vidro por 10 minutos. Ao término do aquecimento, foi adicionado 100,0 µL de ácido acético glacial para neutralizar o extrato, seguido de 5,0 mL de água deionizada e 2,5 mL de hexano. A mistura obtida foi transferida para um novo frasco com tampa e levado ao vortex operando com máxima velocidade durante 1 minuto. Após a agitação o frasco foi incubado em banho de gelo para a separação das fases. A fase superior foi recolhida em outro tubo e a solução remanescente foi lavada uma vez com 2,5 mL de hexano. Então, uma pequena porção de Na₂SO₄ anidro foi adicionado ao frasco para secagem de uma eventual água residual. Por fim, a fase hexânica combinada foi filtrada e transferida para um balão volumétrico de 5,0 mL que foi aferido com hexano. Um pequeno volume desse extrato foi transferido para o vial e diretamente injetado no equipamento de GC-FID.

A reação de transesterificação via catálise ácida (RTCA) foi realizada adicionando 2,0 mL de uma solução 2% v/v de ácido sulfúrico em MeOH ao balão de extração contendo a fração lipídica de massa conhecida. A mistura obtida foi levada ao banho de glicerina com temperatura controlada (50 °C) e sob refluxo utilizando hastes de vidro durante 24 h. Após o término da reação o frasco foi resfriado à temperatura ambiente, foi adicionada uma pequena porção de Na₂SO₄ anidro para secagem da água residual e essa mistura foi filtrada em filtro de papel. O filtrado contendo os FAMES foi transferido para um vial e injetado no equipamento de GC-FID sem qualquer diluição.

6.1.1.3 Condições instrumentais

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo a gás (GC 2010-Plus, Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com autoinjeter AOC-20-i split-splitless e detector por ionização em chama. As corridas cromatográficas ocorreram em uma coluna capilar de sílica fundida CP-SIL 88 para FAME (100 m, 0,25 mm x 0,2 µm) da marca Agilent Technologies (Palo Alto, EUA). Para todas as análises o volume de injeção foi mantido em 1,0 µL, a razão do split foi de 1:30 e as temperaturas do detector FID e do injetor foram fixados em 240 °C. A programação do forno foi: iniciou-se a corrida a 100 °C e manteve-se a temperatura por 5 min, seguida de uma rampa de aquecimento com taxa de 4 °C min⁻¹ até que atingisse 240 °C e então essa temperatura foi mantida por 20

minutos. O fluxo de gás hidrogênio foi mantido em 1,0 mL min⁻¹ e a pressão em 140, kPa.

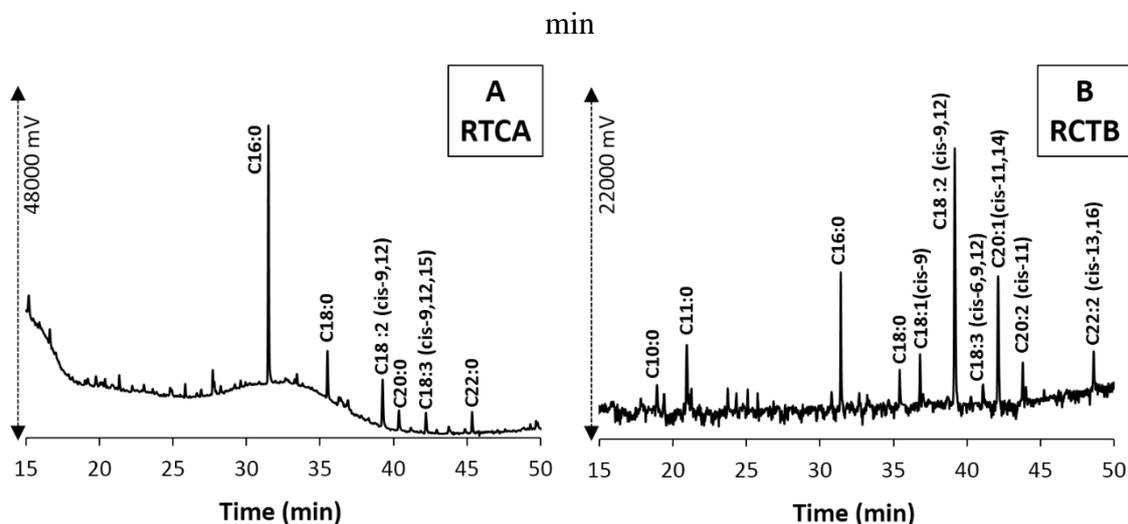
6.1.2 Resultados e discussão

6.1.2.1 Otimização do preparo de amostras

O preparo de amostras foi avaliado submetendo a mesma amostra de lúpulo comercial a três diferentes procedimentos de extração e comparando as massas das frações lipídicas obtidas. O método mais adequado nesse caso seria o que trouxesse um extrato mais limpo, de maior massa e que permitisse a efetividade da reação de transesterificação. Aplicando os três métodos foi possível obter extratos limpos e aptos para serem submetidos às reações de transesterificação. No entanto, empregando o método de extração por Folch e Stanley uma maior massa de extrato lipídico foi obtida (64,6 mg) quando comparada com os métodos por Hara e Radin (44,8 mg) e Bligh e Dyer (17,7 mg). Sendo assim, o método de extração por Folch e Stanley foi adotado como o mais adequado, sendo esse aplicado para a otimização da reação de transesterificação e posteriormente para o trabalho com todas as amostras. É importante ressaltar que vários testes para o ajuste dos volumes das soluções e solventes empregados durante a extração foram feitos, bem como o emprego das vidrarias adequadas e a melhor forma de filtração, sendo esses resultados considerados como iniciais e não discutidos no presente trabalho.

A etapa de reação para produção dos FAMES foi investigada pela comparação do perfil de AG no lúpulo quando empregadas as RTCA e RTCB como mostrado na Figura 23. Empregando a RTCA, o perfil dos FAMES oriundos dos AG presentes no lúpulo estudado pode ser visto pelo cromatograma da Figura 23 A, onde é possível notar uma diminuição dos FAMES insaturados quando comparados com os resultados obtidos empregando a RTCB, cujo resultado é mostrado no cromatograma da Figura 23 B. Considerando a RTCB, os FAMES com cadeias médias e longas, saturadas, monoinsaturadas e poli-insaturadas foram identificados quando submetidos a comparação com o resultado da análise da mistura de FAME padrão, sendo o tempo de retenção dos compostos o parâmetro de avaliação.

Figura 23: Cromatogramas por GC-FID da RTCA (A) e da RTCB (B) da fração lipídica do lúpulo. Condições do GC: coluna capilar CP-SIL 88 para FAME (100 m, 0,25 mm x 0,2 µm); volume de injeção de 1,0 µL; razão do split de 1:30; temperaturas do detector e da injetora fixadas em 240 °C; programação do forno: inicia a 100 °C e é mantida por 5 min, seguido de aumento até 240 °C a uma taxa de 4 °C min⁻¹ e então mantido por 20



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Como destacado anteriormente, apenas pela avaliação do perfil cromatográfico de ambas abordagens é possível distinguir o perfil dos FAMES obtidos pelas diferentes transesterificações. No entanto, a fim de tornar mais clara e exata essa comparação, a quantificação desses FAMES foi feita como é mostrado na Tabela 14. Trabalhando com RTCA, seis AG foram identificados, enquanto que empregando RTCB dez AG foram encontrados. Os AG saturados foram os majoritários quando empregado RTCA. A maior diferença entre as duas abordagens está relacionada ao teor de C16:0, este que se apresenta como 56,75% de toda composição dos AG quando realizado RTCA, enquanto que seu teor decresce para 10,99% quando RTCB foi realizada como método de reação. Outra observação é com relação ao C20:0 e C22:0. Esses AG são encontrados quando RTCA é empregada (5,76% para C20:0 e 4,30% para C22:0) e eles estão ausentes quando RTCB é utilizado. É interessante observar que o C22:2 aparece na proporção de 3,90% trabalhando com RTCB e que C22:0 está em 4,30% considerando RTCA, o que pode estar indicando uma possível conversão de C22:2 a C22:0 quando trabalhou-se com RTCA. Além disso, empregando RTCA, é possível observar a diminuição dos AG insaturados com dezoito carbonos em concomitância com o aumento proporcional de C18:0. Esse fenômeno pode ser evidenciado quando o teor de C18:2(cis-9,12), o AG de

mais elevada concentração, é comparado empregando RTCA e RTCB, sendo 14,85% e 37,27%, respectivamente. Esses resultados indicam que ao aplicar RTCA, reações laterais como o ataque ácido às olefinas reativas podem ocorrer levando os AG insaturados a saturados. Com relação a essas possíveis reações laterais no AG insaturados a partir de reações catalisadas por ácidos, a literatura aponta que longos tempos de refluxo (acima de 6 h), excesso de H₂SO₄ (acima de 20%) ou elevadas temperaturas podem ser responsáveis por esses efeitos, podendo levar até a destruição dos mesmos dos AG poliinsaturados (CHRISTIE, 1993b). Nesse sentido, RTCB foi definido como o método mais adequado para a realização da reação de transesterificação, visto que um perfil de AG do lúpulo mais completo e confiável foi obtido.

Tabela 14: Diferença na composição dos AG do lúpulo quando empregados RTCA e RTCB e analisado por GC-FID

	RTCA (g/100 g lipídeo)	RTCB (g/100 g lipídeo)
C10:0	-	2,78
C11:0	-	11,16
C16:0	56,75	10,99
C18:0	12,34	3,15
C18:1(cis-9)	-	5,40
C18:2(cis-9,12)	14,85	37,27
C20:0	5,76	-
C18:3(cis-6,9,12)	-	3,35
C20:1(cis-11)	-	16,56
C18:3(cis-9,12,15)	5,99	-
C20:2(cis-11,14)	-	5,44
C22:0	4,30	-
C22:2(cis-13,16)	-	3,90

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

6.1.2.2 *Análise das amostras*

Definidos os métodos de extração por Folch e Stanley e a reação de esterificação que promove a derivatização dos AG a FAMES por RTCB, trinta amostras de lúpulo de vinte e quatro diferentes variedades foram analisadas. Todos os cromatogramas

referentes às amostras analisadas são mostrados na Figura 24 e para evidenciar a concentração dos AG encontrados nos diferentes lúpulos a quantificação por normalização de áreas foi feita e os resultados são apresentados na Tabela 15. Quatorze FAMES, entre saturados e insaturados, foram identificados por GC-FID, mas nem todos foram encontrados nas trinta amostras de lúpulo. Os códigos para os FAMES identificados nos cromatogramas da Figura 24 são mostrados na Tabela 15. Alguns AG podem não estar presentes no lúpulo avaliado ou seus respectivos FAMES podem estar abaixo do limite de detecção do método utilizado.

Os AG nas amostras de lúpulo variaram de 0,04 a 9,70 g/100 g de amostra, sendo que esses extremos são representados pelo C16:1(cis-9) no lúpulo Perle e pelo C11:0 no lúpulo Magnum. Sete AG foram identificados e quantificados em todas trinta amostras, sendo eles: C11:0, C16:0, C18:0, C18:1(cis-9), C18:2(cis-9,12), C20:1(cis-11), C20:2(cis-11,14) e C22:2(cis-13,16). Quando comparado com os trabalhos disponíveis na literatura, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1(cis-9) e C18:2(cis-9,12) também foram encontrados por outros pesquisadores (CARRINGTON et al., 1972; KAVANAHO et al., 1975; SANDRA; CLAUS; VERZELE, 1973). Além disso, esses AG são os mais comuns de serem encontrados em plantas (SCHIMID; OHLROGGE, 2002). Outros dois AG identificados por esses autores citados e que também foram encontrados no presente trabalho foram o C18:3(cis-6,9,12) e o C16:1(cis-9). O ácido linolênico (C18:3(cis-6,9,12)) foi encontrado em dez amostras e suas concentrações variaram de 0,14 a 0,55 g/100 g de lúpulo. O ácido palmitoleico (C16:1(cis-9)) foi quantificado em algumas amostras e sua concentração variou de 0,04 a 1,55 g/100 g de lúpulo. Esse AG apresenta alguns interessantes efeitos biológicos, mostrando propriedades antioxidantes e um potencial anti-inflamatório por conseguir inibir a ação da enzima ciclooxigenase COX-I (HENRY et al., 2002) e poder prevenir a apoptose de células β (MORGAN; DHAYAL, 2010).

Como já levantado nesse trabalho, o principal destino do lúpulo é a indústria cervejeira. AG no processo de produção de cervejas podem surgir de diferentes matérias primas utilizadas ao longo das etapas, incluindo os lúpulos. Os AG desenvolvem um importante papel no processo de produção e podem afetar a qualidade do produto acabado, isto é, a cerveja. Portanto, o conhecimento sobre a composição dos AG do lúpulo é de grande importância. Por exemplo, embora o ácido decanóico (C10:0) tenha sido encontrado em baixas concentrações (0,14-3,34 g/100 g de lúpulo), esse AG foi

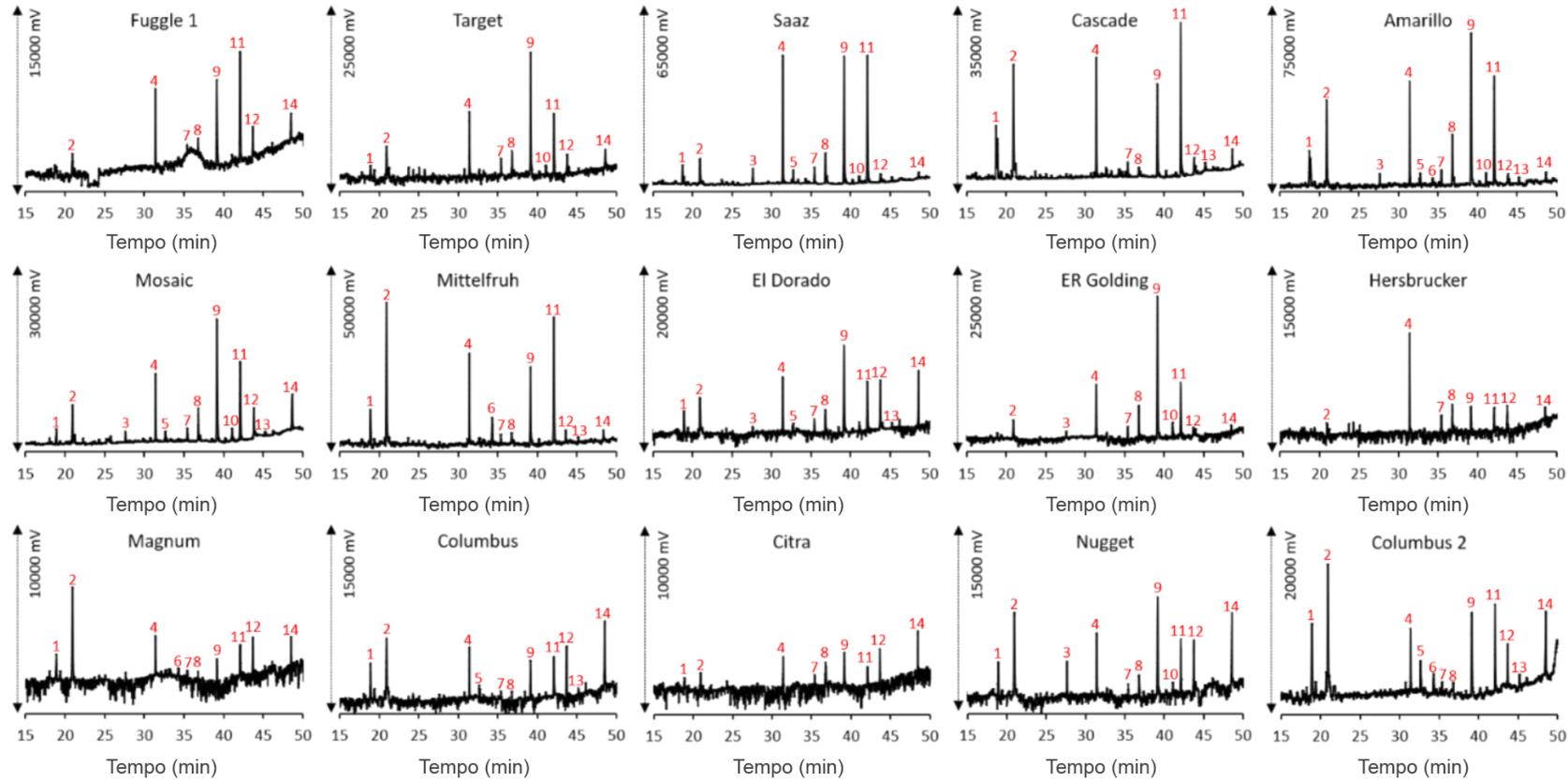
identificado em quase todas amostras e sua presença pode estar associada a notas rançosas na cerveja. Geralmente C10:0 é produzido pelas leveduras durante o processo de fermentação juntamente com outros AG de cadeia média, como o C6:0 e o C8:0 (BRAVI et al., 2017). É interessante comentar que além desse sabor rançoso, vários outros sabores indesejáveis podem contribuir para os chamados *off-flavors* da cerveja.

Os AG insaturados de cadeia longa também são importantes constituintes da cerveja. Eles podem ser usados como compostos marcadores para controle de qualidade, visto que sua oxidação degradativa pode levar a sabor de envelhecimento. Por outro lado, AG saturados podem promover o efeito *gushing* espontâneo na cerveja (BRAVI et al., 2017). Apesar dos AG na cerveja se apresentarem em baixas concentrações e de sua origem surgir de diferentes matérias primas, nesse trabalho também foi feita uma suposição das características de *gushing* dos diferentes lúpulos comerciais estudados. Para isso, a razão entre os teores totais de AG insaturados (*gushing*-supressores) e saturados (*gushing*-promotores) foi feita e os resultados são encontrados na última coluna da Tabela 15. De acordo com os resultados obtidos, a maioria dos lúpulos apresenta uma característica de *gushing*-supressores, visto que a razão foi superior a 1. Columbus2 apresentou o maior valor de razão (4,10), enquanto que o valor mais baixo foi o calculado para o Magnum, principalmente devido a concentração de C11:0.

De acordo com a pesquisa bibliográfica levantada nessa parte do trabalho, pela primeira vez alguns AG insaturados foram observados no lúpulo, sendo eles: o ácido heptadecenóico (C17:1(cis-10)), ácido eicosadienóico (C20:2(cis-11,14)) e o ácido docosadienóico (C22:2(cis-13,16)). O C17:1(cis-10) foi encontrado em quinze amostras de lúpulo, já o C20:2(cis-11,14) e o C22:2(cis-13,16) foram encontrados em todas as amostras de lúpulo. O ácido eicosadienóico (C20:2(cis-11,14)) é um raro AG poliinsaturado encontrado principalmente em tecidos animais (HUANG et al., 2011), mas também já foi identificado na chalota da Pérsia (*Allium hirtifolium* Boiss.) (ISMAIL et al., 2013) e na *Moringa oleifera* Lam. (LEE et al., 2017). Esse AG apresenta atividade antioxidante (HENRY et al., 2002), efeito antibactericida (ISMAIL et al., 2013) e pode modular o metabolismo de AG poliinsaturados a fim de alterar a capacidade de resposta de macrófagos à simulação inflamatória (HUANG et al., 2011). O ácido docosadienóico (C22:2(cis-13,16)), também encontrado na *Nigella sativa* L. (KALIDASU et al., 2017) e na *Sesbania bispinosa* (SHREELALITHA; SRIDHAR, 2016), apresenta atividade antioxidante e potencial inibição contra as enzimas COX-I e

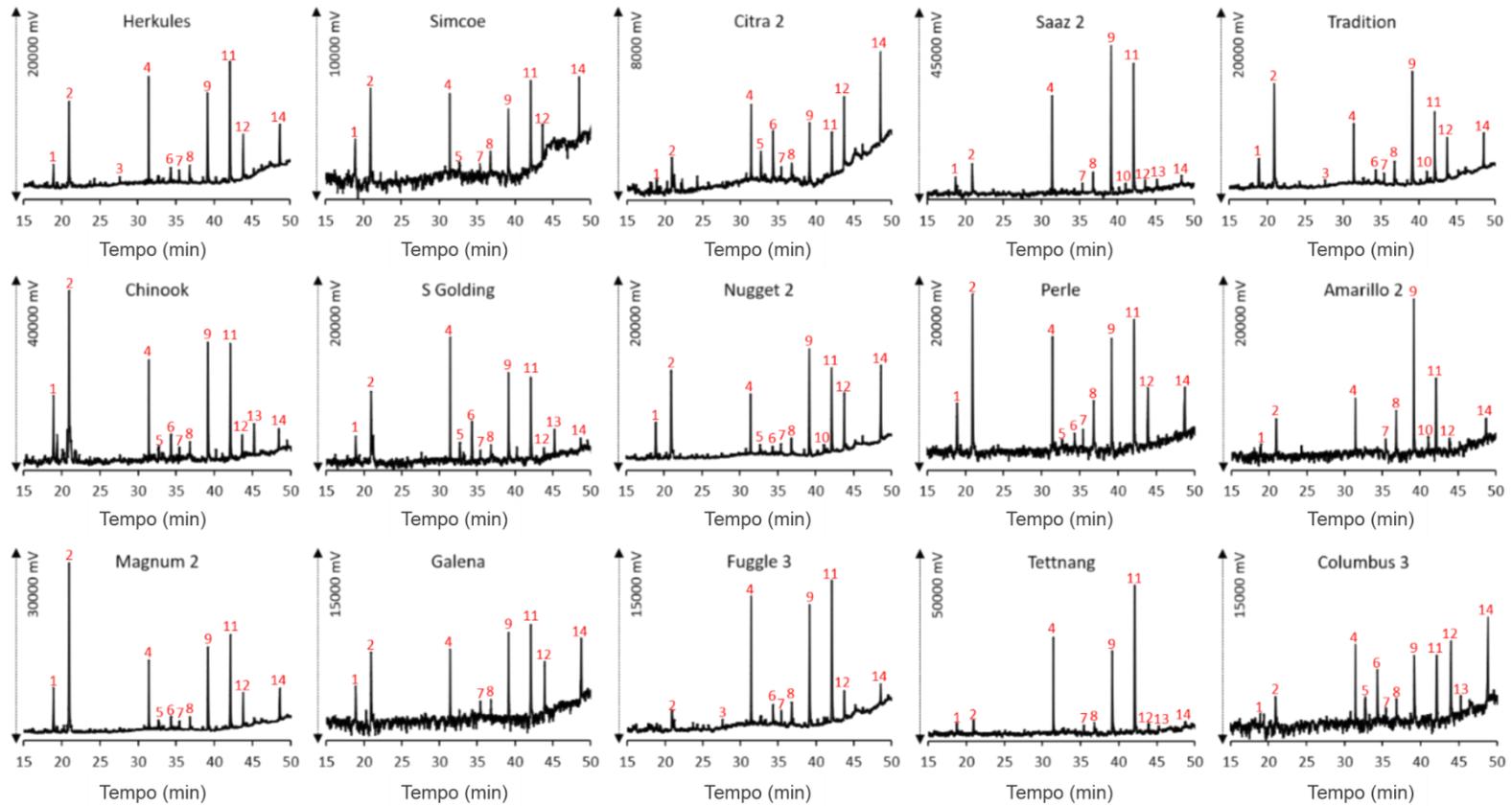
COX-II (HENRY et al., 2002). Por fim, um outro AG monoinsaturado que foi identificado e quantificado em todas as amostras foi o ácido eicosenóico (C20:1(cis-11)). Esse AG foi encontrado em elevadas concentrações quando comparado com os demais, atingindo níveis semelhantes ao C18:2(cis-9,12). O C20:1(cis-11) também apresenta atividade antioxidante e outras atividades biológicas (HENRY et al., 2002). Demireva et al. (1995) e Carrington et al. (1972) reportaram esse AG na composição do lúpulo.

Figura 24: Perfil cromatográfico de FAMES de trinta amostras de lúpulo, considerando vinte e quatro diferentes variedades, por GC-FID, quando empregados os métodos de Folch e Stanley para extração lipídica e a RTCB para transesterificação. Condições do GC: as mesmas descritas na Figura 23.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Figura 24: Continuação



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Tabela 15: Composição dos AG (em g/100 g de planta) de trinta amostras de lúpulo considerando cálculos por normalização de área

Variedade	g AG/100 g lúpulo														Insaturados/ Saturados ^a
	C10:0 1	C11:0 2	C14:0 3	C16:0 4	C16:1 (cis-9) 5	C17:1 (cis-10) 6	C18:0 7	C18:1 (cis-9) 8	C18:2 (cis-9,12) 9	C18:3 (cis-6,9,12) 10	C20:1 (cis-11) 11	C20:2 (cis-11,14) 12	C22:0 13	C22:2 (cis-13,16) 14	
FUGGLE1	-	0,53	-	1,56	-	-	0,18	0,26	2,63	-	2,81	0,67	-	0,57	3,06
TARGET	0,55	1,49	-	3,07	-	-	0,73	0,26	3,34	0,96	2,54	1,09	-	0,74	1,53
SAAZ	0,48	0,51	0,20	1,72	0,16	-	0,24	0,45	2,66	0,16	2,55	0,12	-	0,10	1,97
CASCADE	2,13	3,06	-	1,91	-	-	0,23	0,13	2,23	-	3,76	0,29	0,16	0,42	0,91
AMARILLO	1,65	2,70	0,25	2,11	0,33	0,19	0,38	1,45	4,69	0,39	3,22	0,40	0,15	0,27	1,51
MOZAIC	0,53	1,18	0,14	1,57	0,34	-	0,32	0,87	4,34	0,48	2,61	0,79	0,12	1,07	2,72
MITTRLF RUH	0,83	3,64	-	1,34	-	0,74	0,14	0,16	1,75	-	3,01	0,17	0,11	0,16	0,99
EL DORADO	1,88	2,12	0,22	1,61	0,70	-	0,81	1,12	4,86	-	2,71	1,77	0,26	1,77	1,87
ER GOLDING	-	0,77	0,13	1,35	-	-	0,48	0,81	5,83	0,55	2,14	0,29	-	0,17	3,57
HERSBRUCKER	-	0,50	-	2,49	-	-	1,11	0,86	0,75	-	0,72	0,70	-	0,51	0,86
MAGNUM	2,22	9,70	-	2,18	-	0,80	0,83	1,05	0,78	-	2,23	2,56	-	1,07	0,57
COLUMBUS	2,51	4,29	-	1,66	0,87	-	0,23	0,41	2,11	-	1,93	2,72	0,10	3,62	1,33
CITRA	1,29	1,93	-	3,39	-	-	1,05	2,60	3,40	-	0,51	1,70	-	2,76	1,43
NUGGET	0,96	2,72	0,87	1,28	-	-	0,41	0,65	3,28	0,31	1,77	1,38	-	2,16	1,53
COLUMBUS2	3,35	5,04	-	1,73	1,28	0,73	0,32	0,27	3,35	-	3,37	1,17	0,64	2,30	1,13
HERKULES	0,88	3,64	0,15	2,58	-	0,50	0,28	0,50	3,34	-	4,41	1,67	-	1,29	1,55
SIMCOE	1,40	3,20	-	1,22	0,19	-	0,35	0,55	2,39	-	2,54	0,84	-	1,56	1,31
CITRA2	0,45	1,50	-	2,19	1,12	2,14	0,42	0,50	2,30	-	1,53	2,22	-	3,32	2,88
SAAZ2	0,25	0,66	-	1,41	-	0,14	0,15	0,40	3,19	0,14	2,79	0,12	0,12	0,08	2,64
TRADITION	0,51	2,04	0,08	0,77	-	0,24	0,15	0,35	2,22	0,23	1,34	0,63	-	0,37	1,52
CHINOOK	1,85	0,77	-	2,25	0,52	0,99	0,29	0,31	3,78	-	3,34	0,52	0,89	0,45	1,64
S GOLDING	0,43	1,38	-	1,46	0,43	0,96	0,35	0,16	1,76	-	1,54	0,26	0,35	0,34	1,38

Tabela 15: Continuação

Variedade	C10:0 1	C11:0 2	C14:0 3	C16:0 4	C16:1 (cis-9) 5	C17:1 (cis-10) 6	C18:0 7	C18:1 (cis-9) 8	C18:2 (cis-9,12) 9	C18:3 (cis-6,9,12) 10	C20:1 (cis-11) 11	C20:2 (cis-11,14) 12	C22:0 13	C22:2 (cis-13,16) 14	Insaturados/ Saturados ^a
NUGGET2	1,18	2,34	-	1,12	0,19	0,22	0,12	0,32	3,09	0,26	2,33	1,38	-	2,20	2,10
PERLE	0,79	2,58	-	1,06	0,04	0,15	0,24	0,90	1,85	-	2,00	0,89	-	0,72	1,40
AMARILLO2	0,20	1,10	-	1,33	-	-	0,39	1,10	5,11	0,54	2,71	0,77	-	0,83	3,66
MAGNUM2	1,39	6,16	-	1,63	0,38	0,39	0,21	0,31	2,52	-	3,32	1,04	0,18	0,87	0,92
GALENA	1,00	4,23	-	1,51	-	-	0,41	0,53	2,71	-	3,24	1,80	-	2,21	1,47
FUGGLE3	-	0,59	0,09	2,50	-	0,59	0,34	0,50	3,77	-	4,46	0,69	-	0,42	2,97
TETTANG	0,26	0,40	-	1,90	-	-	0,19	0,13	2,50	-	4,42	0,31	0,08	0,17	2,67
COLUMBUS3	0,15	1,13	-	1,91	1,55	2,70	0,21	0,80	2,77	-	2,04	3,12	0,65	3,59	4,10

^a Códigos para identificação dos compostos nos cromatogramas da Figura 24

^b Razão entre AG insaturados e saturados para a avaliação da característica de *gushing* do lúpulo

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

6.1.3 Conclusão

Essa parte do trabalho reporta o estudo da composição dos AG de trinta amostras de lúpulo, sendo vinte e quatro diferentes variedades. Três métodos de extração lipídica, incluindo Hara e Radin, Bligh e Dyer e Folch e Stanley foram avaliados. Além disso, dois métodos de transesterificação empregando catálise ácida e básica foram confrontados. O preparo de amostras otimizado foi dado pela extração, utilizando o método de Folch e Stanley, seguido do emprego da RTCB. Os métodos definidos foram responsáveis pela obtenção da maior massa de fração lipídica extraída e por levar ao perfil de AG do lúpulo mais completo e sem reações laterais. Considerando a análise de todos os lúpulos, quatorze AG foram determinados, sendo três deles pela primeira vez em lúpulo: o ácido heptadecenóico (C17:1(cis-10)), ácido eicosadienóico (C20:2(cis-11,14)) e o ácido docosadienóico (C22:2(cis-13,16)). De posse da composição do AG do lúpulo, foi possível inferir características dos lúpulos com relação a uma possível contribuição ao efeito de *gushing* na cerveja. O método otimizado nesse trabalho pode ser empregado para a determinação de AG em amostras de lúpulo e os resultados reportados podem ser úteis para diferentes áreas, desde pesquisadores da área de plantas e fitoquímica, até para a indústria cervejeira e produtores de lúpulo.

6.2 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS MAJORITÁRIOS EM AMOSTRAS DE LÚPULO POR ¹H NMR ASSOCIADO A MODELAGEM QUIMIOMÉTRICA COM SELEÇÃO DE VARIÁVEIS

Considerando os métodos para identificação ou determinação de ácidos graxos (AG) em amostras de lúpulo, os principais trabalhos encontrados na literatura, apesar de poucos, são descritos por GC-FID (CARRINGTON et al., 1972; DEMIREVA; TOTOYA, 1995; KAVANAOH et al., 1975; SANDRA; CLAUS; VERZELE, 1973). Os métodos por GC necessitam de etapas de preparo de amostras que geralmente são laboriosas, como a extração lipídica e a transesterificação. Além disso, uma análise cromatográfica por GC leva em torno de 1 h.

Com a proposta de desenvolvimento de métodos que sejam mais rápidos e menos laboriosos no preparo de amostras, abordagens por calibração multivariada vem sendo ao longo de muitos anos uma interessante alternativa aos métodos convencionais. Nas mais diferentes áreas essas abordagens já foram aplicadas, desde alimentos (DUARTE et al., 2017a), passando por fármacos (CHELLINI et al., 2017) e até para petróleo (DUARTE et al., 2016, 2017b). Para o lúpulo não é diferente, já foram realizados trabalhos recentes em que modelos quantitativos por PLS usando infravermelho próximo (NIR), médio (MIR) e Raman foram construídos para determinação total de α -ácidos ou somente de cohumulona e de xanthohumol (KILLEEN et al., 2014). Em um trabalho mais recente, os mesmos autores utilizaram modelagem quimiométrica por análise de PCA para investigar se através de uma varredura na composição da glândula lupulina seria possível selecionar lúpulos com atributos chaves de aroma e sabor (KILLEEN et al., 2017). De acordo com a pesquisa bibliográfica feita para o desenvolvimento desse trabalho, não foi encontrada na literatura uma abordagem em que houvesse uma proposta de determinar os AG do lúpulo por calibração multivariada.

Nesse sentido, essa parte do trabalho visa construir modelos de calibração multivariada empregando a espectroscopia de ¹H NMR como método proposto associado a métodos de PLS com seleção de variáveis para determinar C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:1, C20:2 e C22:2 em amostras de lúpulos comerciais.

6.2.1 Parte experimental

6.2.1.1 Preparo de amostras

O método de referência para alimentar os modelos de calibração multivariada foi o GC. Sendo assim, os procedimentos para extração lipídica (Folch e Stanley) e para transesterificação (via catálise básica) descritos nas seções 6.1.1.2.1 e 6.1.1.2.2, respectivamente, são os mesmo para essa aplicação e, portanto, não serão descritos novamente.

Os espectros de ^1H NMR foram adquiridos de extratos lipídicos de lúpulo empregando o mesmo método de extração por Folch e Stanley descrito na seção 6.1.1.2.1. No entanto, uma massa de amostra menor de lúpulo foi utilizada para que uma menor massa de extrato lipídico fosse obtida. Sendo assim, em torno de 75 mg de lúpulo foi pesado para que ao final da extração fosse obtido uma massa de extrato lipídico próximo a 10 mg. As variedades de lúpulo utilizadas com suas respectivas massas, bem como a massa dos extratos obtidos, estão disponíveis na Tabela 16. De posse do extrato seco em evaporador rotativo, 600 μL de CDCl_3 foi adicionado ao balão de extração e após a solubilização e homogeneização do extrato, o conteúdo foi transferido para o tubo de ^1H NMR de 5 mm de diâmetro, o qual foi tampado para evitar perda de solvente e levado ao equipamento para aquisição do sinal.

Tabela 16: Diferentes variedades de lúpulos utilizadas com suas respectivas massas e as massas de extrato lipídico obtidas após o preparo de amostra.

Variedade	m _{Lup} (mg)	m _{extrato} (mg)
FUGGLE	79,6	11,5
TARGET	71,1	14,0
SAAZ	60,2	7,3
CASCADE	76,6	14,1
AMARILLO	62,7	10,6
MOZAIC	65,9	12,2
MITTRLFRUH	64,5	9,3
EL DORADO	72,3	16,6
ER GOLDING	70,3	14,1
HERSBRUCKER	63,8	7,1
MAGNUM	75,8	20,1
COLUMBUS	67,5	17,4
CITRA	60,5	12,7
NUGGET	71,6	13,6
COLUMBUS	75,0	14,6
HERKULES	76,0	14,0
SIMCOE	73,4	11,2
CITRA	76,3	15,0
SAAZ	72,9	6,9
TRADITION	74,4	8,0
CHINOOK	71,8	13,1
S GOLDING	72,7	10,8
NUGGET	79,2	10,9
PERLE	75,1	7,3
AMARILLO	78,3	12,6
MAGNUM	78,5	17,3
GALENA	75,4	13,6
FUGGLE	76,8	11,3
TETTNANG	74,2	7,3
COLUMBUS	74,9	17,1

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

6.2.1.2 Condições instrumentais

As condições instrumentais para a análise por GC (método de referência) estão descritas na subsubseção 6.1.1.3. As aquisições espectroscópicas foram feitas em um espectrômetro Brucker Avance III operando em 500 MHz. Os espectros obtidos foram calibrados de acordo com o deslocamento químico do solvente deuterado empregado

para diluição das amostras (CDCl_3 – deslocamento residual de hidrogênio 7,28 ppm), valendo-se, ainda, do tetrametilsilano como referência interna.

6.2.1.3 Modelagem multivariada

O primeiro passo para realização de uma modelagem multivariada é a organização adequada dos dados. As informações dos teores dos AG majoritários (C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:1, C20:2 e C22:2) e presentes em todas amostras de lúpulo obtidas por GC (subseção 6.1) foram utilizadas como referência, sendo essas individualmente agrupadas em um vetor \mathbf{y} . Nesse trabalho foi utilizado o PLS1, onde cada analito foi determinado por um modelo PLS. Nesse sentido, sete vetores \mathbf{y} foram organizados de maneira que em cada um deles contivesse as informações dos teores dos respectivos AG nas 30 diferentes amostras; \mathbf{y} (30x1).

A espectroscopia ^1H NMR foi empregada como o método instrumental proposto para correlacionar com as informações de referência, sendo os espectros de 30 amostras agrupados em uma matriz \mathbf{X} . Nesse sentido, a matriz contendo os espectros apresentou ordem \mathbf{X} (30x39330), onde cada linha faz referência a uma amostra da Tabela 16, enquanto que em cada coluna está alocado um valor de deslocamento químico que é tratado como uma variável. É importante ressaltar que essas 39330 variáveis dizem respeito a uma faixa espectroscópica que varia de 0 a 12 ppm, sendo essa a faixa empregada para construir os modelos com todas as variáveis, chamado aqui somente de PLS. Essa abordagem quimiométrica aplicada com a finalidade quantitativa é amplamente difundida na literatura (ANDERSSON, 2009). No PLS, as matrizes \mathbf{X} e \mathbf{y} são relacionadas através de uma relação linear e cada uma delas é decomposta através de uma soma de variáveis latentes (sigla do inglês, LV) (WOLD; SJOSTROM, 2001).

É possível perceber que a matriz \mathbf{X} apresenta uma grande dimensão em virtude das muitas variáveis geradas por ^1H NMR. Muitas dessas variáveis podem estar altamente correlacionadas e isso não é interessante para o modelo. Além disso, nem todas variáveis estão necessariamente relacionadas com a variabilidade gerada pelas informações do método de referência, podendo não apresentar relativa importância para a construção do modelo ou até mesmo influenciar negativamente na capacidade preditiva do modelo, o que em última instância geraria modelos com erros de previsão mais elevados (MEHMOOD et al., 2012).

Além do PLS utilizando todas as variáveis do sistema, dois métodos de seleção de variáveis proposto por Laars Norgaard et al. (2000b) foram empregados, sendo esses o iPLS e o siPLS. O iPLS é baseado na segmentação de todo conjunto espectral, seguido da construção de modelos PLS em todos os segmentos e avaliação comparativa da raiz quadrada do erro médio de validação cruzada (RMSECV – sigla do inglês para *Root Mean Square Error of Cross Validation*) de cada modelo intervalado com o RMSECV obtido pelo modelo global. O número de segmentos em que o espectro é dividido é definido pelo usuário. Já o siPLS funciona como uma expansão do iPLS, onde todas possíveis combinações de modelagem PLS utilizando dois, três ou mais intervalos são calculados e o RMSECV também é tido como parâmetro comparativo. Para o siPLS o custo computacional é maior devido ao elevado número de arranjos possíveis a medida que aumenta o número de intervalos combinados (WU et al., 2010). Nesse trabalho foram feitos testes dividindo o conjunto espectral em 20, 50 e 100 intervalos e para a modelagem com siPLS, o sinergismo entre 2 intervalos também foi testado.

Uma etapa prévia a modelagem multivariada propriamente dita foi o pré-processamento dos dados brutos. Essa etapa é fundamental para a maioria das aplicações em calibração multivariada, pois permite corrigir efeitos indesejados (artefatos), transformando os dados originais em dados mais “limpos” e mais adequados para modelagem. É discutido na literatura que para se trabalhar com dados de ^1H NMR com a finalidade de construção de modelos para calibração multivariada, é muito indicado o alinhamento dos espectros, principalmente ao se trabalhar com amostras complexas (DUARTE et al., 2016, 2017b; SAVORANI; TOMASI; ENGELSEN, 2010). Além do alinhamento, três outros pré-processamentos espectrais para ajuste de linha base foram testados: filtro derivativo Savitzky-Golay (Deriv) (SAVITZKY; GOLAY, 1964b), a transformação SNV (BARNES; DHANOA; LISTER, 1989) e o airPLS (ZHANG; CHEN; LIANG, 2010). As abordagens com esses pré-processamentos foram submetidas a comparação por meio da avaliação visual dos espectros pré-processados, da variância explicada nas componentes principais (PCs) e dos parâmetros de avaliação de desempenho da modelagem. É importante comentar que esse pré-processamento para ajuste de linha base foi realizado após o alinhamento dos espectros e após a separação do conjunto de dados. O conjunto de dados iniciais foi

separado em subconjuntos de calibração (70%) e previsão (30%) utilizando a abordagem de Kennard-Stone (KS) (KENNARD; STONE, 1969).

Considerando uma avaliação geral dos modelos obtidos, os principais parâmetros de comparação foram os valores de erros que expressam a exatidão e o ajuste dos modelos dados pelos coeficientes de correlação, ambos para as etapas de calibração (treino) e previsão (teste). Os erros foram calculados pelo RMSECV dado pela equação 5 e pela raiz quadrada do erro médio de previsão (RMSEP – sigla do inglês para *Root Mean Square of Prediction*) dado pela equação 6. Além desses parâmetros, o número de LVs também foi levado em consideração para definição dos melhores modelos. É importante ressaltar que a relevância química de uma região selecionada por um eventual modelo foi avaliada, isto é, foi checada se a região indicada pelo modelo intervalado apresentava sinais característicos de AG.

$$RMSECV = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_r - y_p)^2}{n_c}} \quad (5) \quad e \quad RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_r - y_p)^2}{n_p}} \quad (6)$$

Os parâmetros y_r e y_p dizem respeito aos valores de referência e previsão respectivamente, enquanto que n_c e n_p se referem ao número de amostras dos conjuntos de calibração e previsão, respectivamente. O coeficiente de determinação para as etapas de calibração onde foi aplicada a validação cruzada (R^2_{cv}) e para a previsão (R^2_p) são dados pela equação 7

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_i (y_r - y_p)^2}{\sum_i (y_r - \bar{y})^2} \quad (7)$$

onde y_r e y_p são dados pelos mesmos valores de referência e de previsão e \bar{y} é a média do vetor contendo os valores de referência.

6.2.2 Resultados e discussões

6.2.2.1 Análise qualitativa dos espectros

Com o intuito de relacionar as regiões espectrais selecionadas pelos modelos intervalados com os AG a serem determinados, conhecer as principais regiões dos

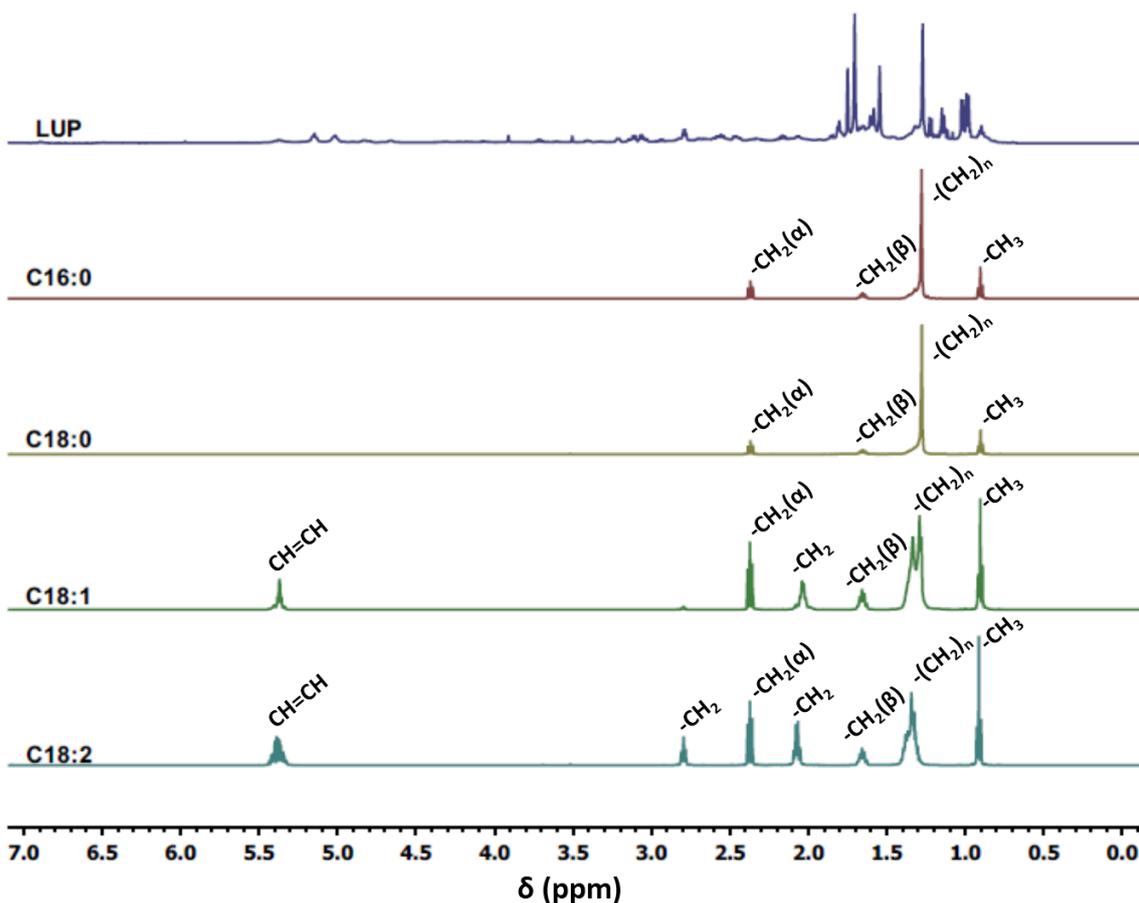
espectros das amostras se torna uma importante tarefa. Para isso, foram adquiridos espectros de ^1H NMR de padrões analíticos de alguns AG e seus sinais foram atribuídos. Como nessa parte do trabalho o objetivo foi determinar AG saturados e insaturados, com uma e duas insaturações, foram avaliados os espectros de C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2, que são bons representantes dos analitos avaliados, uma vez que os sinais de ^1H NMR para esses três tipos de AG são semelhantes. A Figura 25 mostra os espectros para os quatro AG e para uma amostra de lúpulo.

Para os AG saturados (C16:0 e C18:0) os mesmos quatro sinais são observados, sendo os dois mais desblindados, centrados em 2,37 ppm e 1,66 ppm, correspondentes aos hidrogênios metilênicos (CH_2) na posição α e β em relação ao carbono carboxílico, respectivamente. O sinal centralizado em 0,90 ppm se apresenta em uma região de deslocamento muito característica de hidrogênios metílicos (CH_3), provavelmente relacionado ao carbono em posição terminal dos AG saturados. Além disso, observa-se um sinal bastante intenso centralizado em 1,28 ppm, característico de hidrogênios metilênicos, os quais seriam atribuídos aos demais hidrogênios metilênicos da estrutura dos AG saturados.

De forma análoga, esses mesmos sinais descritos anteriormente são observados para os AG insaturados. No entanto, outros sinais são identificados, como o centralizado em 5,37 ppm que é característico de hidrogênios metínicos (CH) ligados a carbono com hibridização sp^2 , bem como o sinal centralizado em 2,04 ppm atribuído aos hidrogênios metilênicos, estes que são mais desblindados por conta da proximidade com a olefina. Para o C18:2 essa desblindagem do hidrogênio metilênico é ainda mais evidente por estar em um ambiente químico adjacente a duas insaturações, o que é confirmado pelo sinal em 2,79 ppm.

Já o espectro da fração lipídica é muito mais complexo devido aos muitos componentes presentes e também pela grande probabilidade da maioria dos AG não estarem na forma livre, isto é, se encontrarem na forma de triacilglicerol. Esses fatores têm implicância direta no deslocamento dos sinais, o que dificulta uma atribuição direta dos sinais no espectro de ^1H NMR da fração lipídica do lúpulo.

Figura 25: Espectros de ^1H NMR (500 MHz) para uma amostra de extrato lipídico de lúpulo (LUP) e para os AG C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2, bem como as atribuições dos principais sinais dos AG.

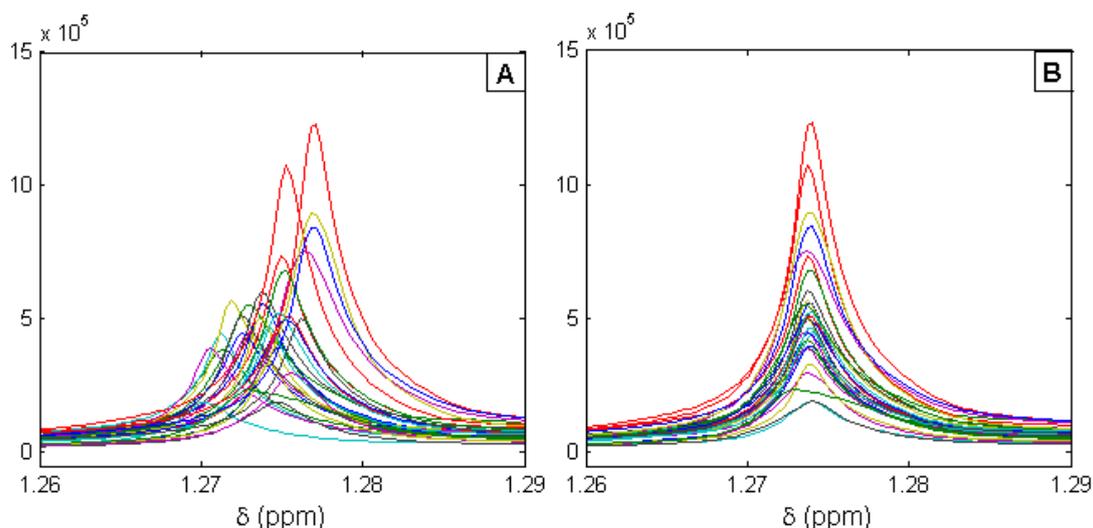


Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

6.2.2.2 Estruturação do protocolo de modelagem

Para que uma mesma abordagem fosse dada a todos os AG, um protocolo de modelagem foi estabelecido pois existiam muitas variáveis a serem avaliadas. Desde o tipo de pré-processamento adotado à forma de separação dos dados, vários testes foram feitos. O primeiro passo para todas modelagens foi o alinhamento espectral utilizando a ferramenta icoshift, cujo seu efeito pode ser observado quando uma aproximação é feita em um determinado sinal do espectro, como mostrado na Figura 26.

Figura 26: Efeito visual do alinhamento pela utilização da ferramenta icoshift



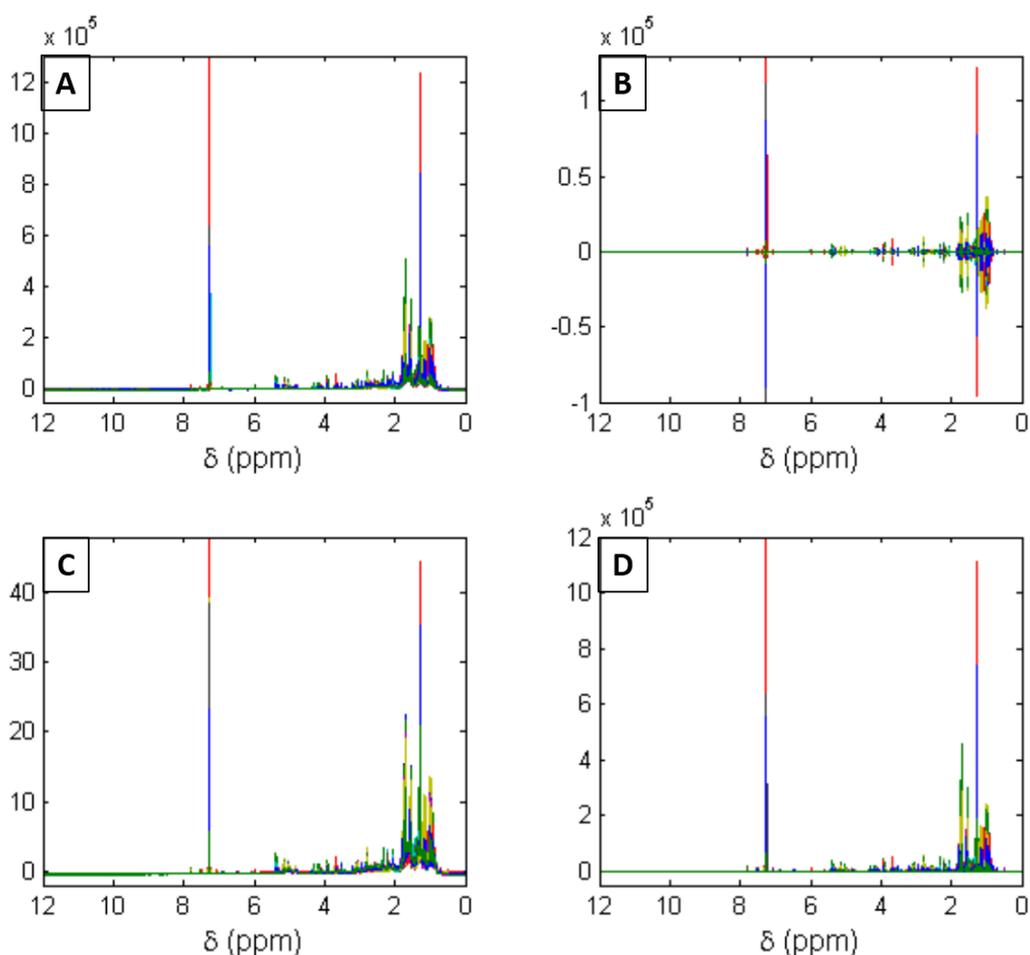
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Após o alinhamento dos espectros, os dados foram separados nos conjuntos de calibração e previsão. O método KS foi definido como o mais adequado para separação dos dados, pois selecionava as amostras de maneira que ao fim do processo o modelo apresentava menores valores de RMSEP. O método de ordenar as amostras em ordem crescente com relação aos valores de y e, em seguida, a cada 3 retirar uma para o conjunto de previsão também foi testado, mas os modelos apresentavam maiores valores de RMSEP.

Numa próxima etapa, além de utilizar os dados somente alinhados, os métodos de pré-processamento Deriv, SNV e airPLS foram empregados e todas essas abordagens foram comparadas. A primeira comparação se deu pelo efeito visual dos espectros após os pré-processamentos, como mostrado na Figura 27. Por meio da análise visual, em todas as abordagens a linha base parece ser muito semelhante com uma melhora significativa para a abordagem por airPLS. Além disso, um outro ponto interessante é que para Deriv e SNV há mudanças nos gráficos espectrais. Para o SNV, o perfil é o mesmo, mas a magnitude dos dados é alterada, enquanto que para a Deriv, além da mudança na magnitude do eixo-y, o perfil espectroscópico é alterado. Já para o airPLS nem o perfil, nem a magnitude dos dados são alterados. No entanto, essa abordagem visual é muito limitada, sendo necessário uma avaliação mais profunda. A segunda avaliação foi feita por meio de uma modelagem por PCA, a fim de avaliar o percentual

da variância explicada das variáveis originais pelas PCs. Os resultados estão disponíveis na Tabela 17. Para todas as abordagens a variância explicada total foi elevada, em torno de 97%. No entanto vale destacar que para Deriv e airPLS, o percentual da PC1 diminuiu e o da PC2 aumentou quando comparada com a abordagem pelos dados somente alinhados, o que para um modelo de classificação poderia ser mais interessante e não necessariamente para um modelo de regressão. Os resultados para a abordagem por SNV foram muito semelhantes aos da abordagem somente alinhada. No entanto, uma definição do melhor pré-processamento ainda não era possível.

Figura 27: Avaliação dos pré-processamentos nos espectros quando: somente alinhados (A); alinhados e aplicando o filtro derivativo Savitzki-Golay (B); alinhados e aplicando a transformação SNV (C); alinhados e aplicando a correção de linha base airPLS (D)



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Tabela 17: Variância explicada para as três principais PCs considerando os testes de pré-processamento

	PC1%	PC2%	PC3%	Total%
Alinhado	89,42	6,92	1,21	97,55
Alinhado + Deriv	82,81	10,62	2,65	96,08
Alinhado + SNV	88,72	7,36	1,19	97,27
Alinhado + AirPLS	82,15	13,69	1,87	97,71

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Sendo assim, utilizou-se a determinação de um AG para testar os diferentes pré-processamentos tendo como parâmetros fundamentais a capacidade preditiva do modelo e a correlação entre os valores de referência e previsão, para ambas etapas, isto é, calibração e previsão. O AG C16:0 foi utilizado para essa avaliação comparativa. Muitos testes foram feitos e os 25 principais são mostrados no esquema da Figura 28. Essa figura contém dois gráficos de barras, um contendo os valores de R^2 para as etapas de validação cruzada e para previsão (gráfico A) e o outro contendo os valores de RMSE, também para as etapas de calibração e previsão (gráfico B). Além disso, ao lado dos gráficos de barras, é dada uma tabela evidenciando o pré-processamento, o tipo de modelagem, o(s) intervalo(s) utilizado(s) para construir a modelagem para o caso de iPLS e siPLS e o número de LVs. Para todas as abordagens de pré-processamento foram avaliados modelos utilizando todas as variáveis (PLS), empregando iPLS e siPLS. Para os testes com iPLS e siPLS, dentre os muitos resultados, são mostrados os com melhores resultados.

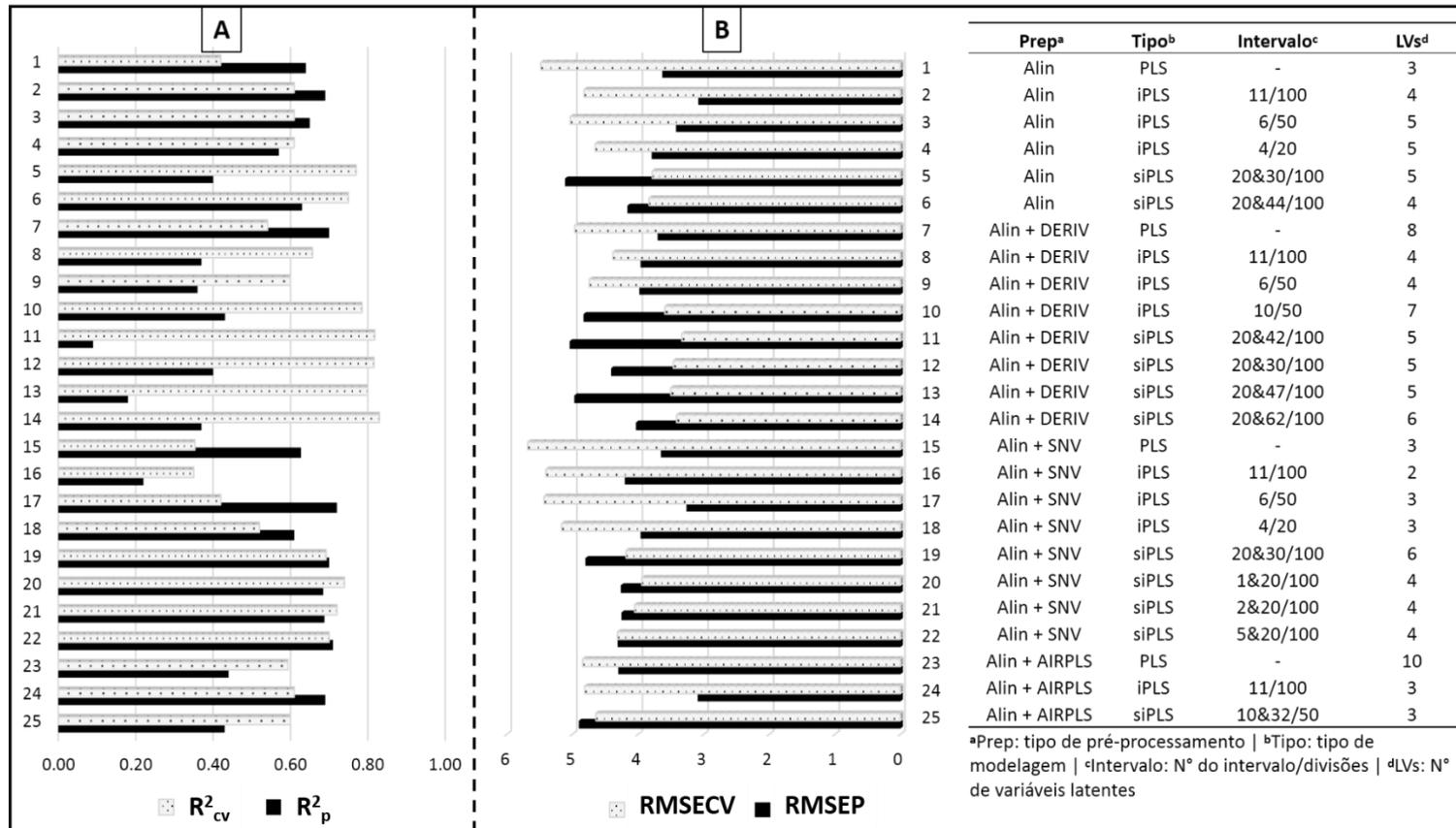
O interesse seria por modelos que apresentassem maiores valores de R^2 (gráfico A com barras mais elevadas) e menores RMSE (gráfico B com barras mais baixas) para ambas as etapas. Considerando os modelos que utilizam todas as variáveis (ensaios 1, 7, 15 e 23) os valores de R^2 foram mais baixos e os de RMSE foram mais altos para ambas as etapas. A partir dos resultados dos modelos com todas as variáveis foram avaliados modelos intervalados para todos os pré-processamentos. Foram testadas as separações de dados em 20, 50 e 100 intervalos e para o siPLS o sinergismo entre 2 intervalos também foi avaliado. Para os modelos intervalados obteve-se uma melhora nos parâmetros quando comparados com o modelo global, como pode ser visto pela

comparação entre as modelagens 1 (PLS – global) e 2 (iPLS), onde são considerados os espectros somente alinhados. Outro exemplo pode ser visto pelas modelagens 15 (global) e 19 (siPLS), onde os espectros foram alinhados e pré-processados com SNV.

Além disso, outro ponto a ser destacado é que, de maneira geral, os valores de R^2_{cv} e R^2_p (gráfico A) foram mais baixos e discrepantes entre si, sendo que na maioria dos casos o R^2_{cv} foi muito superior ao R^2_p . Uma das possíveis causas para explicar esse baixo valor de R^2 é o pequeno número de amostras empregados no trabalho (30), sendo somente 9 para previsão. Diante de todos os testes, as abordagens aplicando SNV foram superiores aos demais, principalmente pela análise do gráfico A, em que o R^2 para ambas as etapas, apesar de não ser tão expressivo, ficou em torno de 0,70 para a maioria dos testes realizados. Nesse sentido, o SNV foi adotado como pré-processamento mais adequado e então um protocolo foi estabelecido para a tentativa de construção de modelos de calibração multivariada para os demais AG, sendo que as etapas definidas foram: i) importação e organização dos dados em matrizes \mathbf{X} contendo os espectros e \mathbf{y} contendo os valores de referência; ii) alinhamento dos espectros utilizando o algoritmo icoshift; iii) separação dos dados usando o algoritmo KS, sendo 70% para calibração e 30% para previsão; iv) pré-processamento das submatrizes de calibração (\mathbf{X}_{cal}) e de previsão (\mathbf{X}_p) com SNV; v) avaliação do modelo global, levando em consideração todas as variáveis (PLS); vi) busca de intervalos que forneçam modelos com melhor performance que o global, sendo que para isso foram avaliadas segmentações de 20, 50 e 100 intervalos, considerando o iPLS e, para o siPLS, o agrupamento de dois intervalos considerando os testes com as mesmas 20, 50 e 100 divisões.

Para o C16:0 foi definido o modelo número 22 como o mais adequado, sendo o R^2 o fator responsável visto que para a maioria das modelagens esses valores foram baixos, mas para o C16:0 em ambas as etapas os valores foram superiores a 0,70 (0,70 e 0,71 para calibração e previsão, respectivamente). Os erros não foram os mais baixos comparados com os outros, mas a diferença não foi muito grande. Esse e os outros modelos serão mais detalhadamente discutidos na próxima seção.

Figura 28: Principais parâmetros para os modelo testados para determinação de C16:0 no lúpulo por ¹H NMR: R²_{cv} e R²_p (A); RMSECV e RMSEP (B); informações de pré-processamento, tipo de modelagem, definição dos intervalos e LVs



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

6.2.2.3 Modelagem dos AG no lúpulo por siPLS

Com o protocolo de modelagem estabelecido foi realizada a tentativa de construção de modelos de calibração multivariada para os AG C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:1, C20:2 e C22:2. Como para o C16:0 discutido anteriormente, foram avaliados os resultados empregando o modelo global e modelos intervalados por iPLS e siPLS, levando em consideração diferentes segmentações do conjunto de dados inicial. Para todos os casos, os modelos intervalados apresentaram melhores performances que os modelos globais, onde são utilizadas todas variáveis.

Alguns modelos por iPLS apresentaram interessantes resultados, mas os melhores foram conseguidos por siPLS. É preciso destacar que de maneira geral a performance das modelagens foi baixa para os analitos avaliados, visto que baixos valores de correlação (R^2) foram obtidos para as etapas de calibração e previsão, bem como valores de erros (RMSE) elevados, também para ambas as etapas. Na Tabela 18 são mostrados os resultados de modelagem para todos os analitos.

Considerando todos os AG, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 18, valores em torno de 0,70 foram alcançados para os R^2 das etapas de calibração e validação, com exceção do C18:0 que apresentou valores superiores a 0,8 para ambas as etapas e dos AG C18:1 e C20:2, em que praticamente não houve correlação nas etapa de calibração (R^2_{cv} de 0,46 para C18:1) e previsão (R^2_p de 0,23 para C20:2), respectivamente. Os valores de RMSECV e RMSEP foram inferiores à média do vetor y para todos os analitos e em alguns casos foram inferiores ao menor valor do vetor como para o C16:0 (menor valor 7,37 g/100 g de extrato lipídico e os RMSE foram 4,31 g/100 g de extrato lipídico), mas outros os valores de erro foram superiores ao menor valor do vetor, como para o caso do C18:0 em que o RMSECV foi de 1,79 g/100 g de extrato lipídico e o menor valor do vetor foi de 0,94 g/100 g de extrato lipídico.

Os modelos utilizaram um número relativamente baixo de LVs, variando de 2 para o C18:2 a 5 para o C20:1 e é importante ressaltar que o número de variáveis espectrais reduziu muito quando comparado com os modelos globais, em que 39330 variáveis eram utilizadas. Para os modelos siPLS com divisões em 50 intervalos foram utilizadas 1574 variáveis e para os modelos siPLS com divisões em 100 intervalos, 788 variáveis foram empregadas. Essa redução de variáveis é significativa para a modelagem, uma vez são obtidos modelos com melhores performances, sendo esses mais parcimoniosos.

Por fim, é importante destacar que os intervalos indicados pelos modelos siPLS são regiões espectrais em que sinais referentes aos analitos são encontrados, de acordo com as atribuições feitas na subsubseção 6.2.2.1. Para o C16:0, 100 divisões do espectro foram feitas, sendo selecionada uma região de linha base (intervalo 4 – 0,4-0,5ppm) que não apresenta nenhum sinal, mas contribui para o ajuste do modelo e uma região entre 2,0 e 2,1 ppm (intervalo 20 de 100) ppm que é uma região de hidrogênios metilênicos, não aparente no padrão de C16:0, mas que pode estar deslocada por conta da matriz. Para o C18:0, as regiões 2,3-2,4ppm (intervalo 23 de 100) e 3,1-3,2 ppm (intervalo 31 de 100) foram selecionadas. Essas também são regiões de hidrogênios metilênicos, sendo que a primeira (2,3-2,4 ppm) pode ser mais relacionada ao C18:0 por ser a região de CH₂ (α) ao grupo carboxílico. Para os insaturados, intervalos representando deslocamentos químicos maiores foram selecionados, principalmente podendo ser relacionados aos hidrogênios metínicos olefínicos, como é o caso do C18:1 (intervalo 27 de 50 – 5,2-5,4 ppm), C20:2 (intervalos 26 e 27 de 50 – 5,0-5,2 e 5,2-5,4 ppm) e C22:2 (intervalo 58 de 100 – 5,8-5,9 ppm). Para o C18:2 também foi selecionada uma região de linha base como para o C16:0 (intervalo 23 de 50 – 4,4-4,6 ppm) e a principal região pode ser associada a hidrogênios metilênicos mais desblindados por conta da proximidade com as insaturações (intervalo 15 de 50 – 2,8-3,0). Para o C20:1, o modelo selecionou uma região com sinal de maior intensidade do espectro (intervalo 14 de 100 – 1,3-1,4 ppm) relacionado ao maior número de hidrogênios metilênicos equivalentes, além da região de 2,1 a 2,2 ppm que em que AG insaturados apresentam sinais de hidrogênios metilênicos um pouco mais desblindados por conta da proximidade com a dupla ligação.

Tabela 18: Principais parâmetros de modelagem obtidos por siPLS para C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:1, C20:2 e C22:2

	C16:0	C18:0^b	C18:1	C18:2	C20:1	C20:2	C22:2
Tipo	siPLS	SiPLS	siPLS	siPLS	siPLS	siPLS	siPLS
Intervalo	5&20/100 ^a	23&31/100int-2	16&27/50int	15&23/50int	14&21/100int	26&27/50int	23&58/100int
δ (ppm)	0,4-0,5 / 2,0-2,1	2,3-2,4 / 3,1-3,2	3,0-3,2 / 5,2-5,4	2,8-3,0 / 4,4-4,6	1,3-1,4 / 2,1-2,2	5,0-5,2 / 5,2-5,4	2,3-2,4 / 5,8-5,9
NV ^c	788	788	1574	1574	788	1574	788
LVs	4	4	3	2	5	3	4
R ² _{cv}	0,70	0,82	0,46	0,75	0,68	0,61	0,70
R ² _p	0,71	0,84	0,71	0,79	0,69	0,23	0,68
RMSECV	4,31	1,79	3,31	5,88	6,41	2,74	3,53
RMSEP	4,31	0,77	2,65	5,86	5,69	4,51	4,85

^aIntervalos utilizados/divisões do espectro | ^bPara o C18:0 foram usadas 29 amostras | ^cNV - Número de Variáveis

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

6.2.3 Conclusão

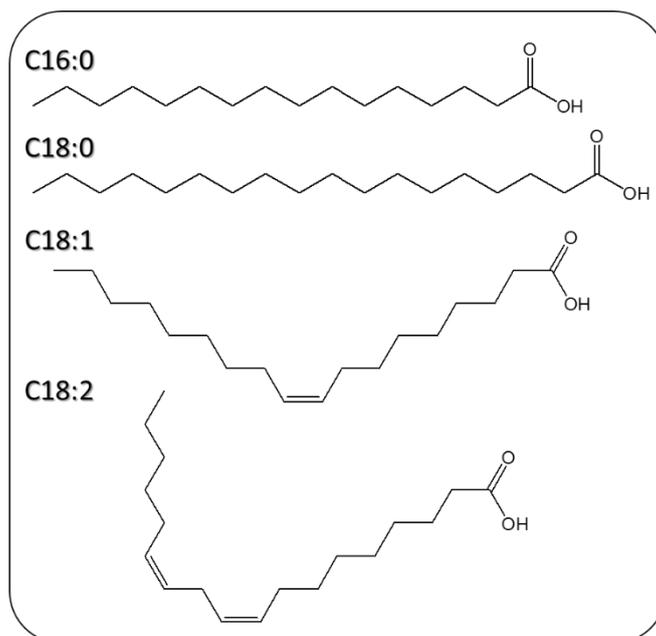
Nessa parte do trabalho investigou-se a construção de modelos de calibração multivariada para determinação dos AG C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:1, C20:2 e C22:2 em amostras de lúpulos comerciais à partir de dados espectroscópicos de ^1H NMR. Para tanto, as concentrações desses AG obtidas por GC-FID foram utilizadas como referência. Os AG foram modelados por PLS, iPLS e siPLS. Após os dados serem alinhados, foram avaliados três tipos de pré-processamentos (Derivada, SNV e airPLS), sendo que o SNV apresentou melhores resultados. Os modelos desenvolvidos em intervalos menores foram mais eficientes que os modelos globais, em que todas as variáveis eram utilizadas, visto que apresentavam maiores coeficientes de correlação e menores erros. As modelagens para determinação dos AG a partir dos extratos lipídicos se mostrou complexa, principalmente devido a complexidade da matriz, o que refletiu nos valores dos principais parâmetros de avaliação dos modelos (R^2_{cv} , R^2_p , RMSECV, e RMSEP). Além da complexidade da matriz, outros dois fatores podem justificar a dificuldade de modelagem apresentada, sendo estes: o baixo número de amostras, sendo que de um total de 30, 21 foram utilizadas para calibração e somente 9 para previsão; há falta de linearidade dos dados, o que justificaria a dificuldade de modelar os dados por um modelo PLS, que é bilinear. Para tanto, algumas propostas para se obter melhores parâmetros de modelagem seriam: testes de outros métodos de seleção de variáveis mais sofisticados, como o CARS (sigla do inglês para *competitive adaptative reweighted sampling*) e os algoritmos genéticos; testar modelos de regressão não-lineares, como as redes neurais ou as máquinas de vetores de suporte; ou tentar trabalhar com um número maior de amostras, que inclusive permitiria uma avaliação mais criteriosa da presença de amostras anômalas (*outliers*). No entanto, a abordagem aqui apresentada sinaliza positivamente para a construção de modelos de calibração multivariada para determinação de AG em amostras de lúpulo por ^1H NMR. Essa proposta é interessante uma vez que ao se ter um método espectroscópico correspondente ao método de referência (GC-FID) é eliminada a etapa de transesterificação, o que culmina em uma considerável economia de tempo e de reagentes. Além disso, uma análise de GC dura em média de 1 h, enquanto que uma aquisição no espectrômetro ocorre em torno de 2 minutos, o que aumenta consideravelmente a frequência analítica.

6.3 DETERMINAÇÃO DOS ÁCIDOS PALMÍTICO, ESTEÁRICO, OLEICO E LINOLEICO EM LÚPULOS POR CZE-UV

Como discutido na subseção 6.1 poucos trabalhos envolvendo análises qualitativas ou quantitativas de AG em lúpulos estão disponíveis na literatura. Os trabalhos existentes empregam basicamente GC, sendo que a metodologia completa de análise para amostras de lúpulo por essa técnica envolve uma etapa de extração lipídica seguida de uma reação de esterificação para análises dos FAMES. De acordo com a revisão bibliográfica feita nesse trabalho, não foi encontrado nenhum trabalho envolvendo a determinação ou identificação de AG em lúpulos por CE.

Nesse sentido, essa parte do trabalho tem como objetivo mostrar o estudo de uma metodologia para determinação de C18:0, C16:0, C18:1 e C18:2 (estruturas moleculares em Figura 29) em amostras de lúpulo por CZE. Para tanto, a etapa de preparo de amostras foi estudada pela comparação de quatro diferentes abordagens, três delas envolvendo uma etapa prévia de extração lipídica seguida de uma reação de saponificação e uma outra envolvendo a saponificação direta de uma amostra de lúpulo. Por fim, a validação do método para a aplicação em amostras de lúpulo foi feita por meio da avaliação dos principais parâmetros de validação para um método analítico.

Figura 29: Estruturas moleculares para C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

6.3.1 Parte experimental

6.3.1.1 Reagentes e amostras

Todos os reagentes, solventes e padrões analíticos foram obtidos em grau analítico. A água utilizada para o preparo de algumas soluções aquosas foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Fosfato monobásico e dibásico de sódio (NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4 , respectivamente), acetonitrila (ACN), hexano, metanol (MeOH), clorofórmio, isopropanol, sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e cloreto de sódio (NaCl) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Polyoxietileno 23 lauril éter (Brij 35), dodecilbenzenosulfonato de sódio (SDBS) foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). N-octanol foi obtido junto a Merck (Merck, Rio de Janeiro, Brasil).

Soluções de Na_2SO_4 0,5 mol L^{-1} e NaCl 0,9% m/v usados nos métodos de extração foram preparadas em água deionizada. NaOH 1,0 mol L^{-1} para o condicionamento inicial do capilar e para limpeza entre as corridas foi preparado em água deionizada e o NaOH 0,5 mol L^{-1} para as reações de saponificação foi preparado em MeOH. Soluções estoques de alguns constituintes do BGE foram preparadas em água deionizada, sendo elas: Brij 35 (100,0 mmol L^{-1} – estocado a 4 °C), SDBS (50,0 mmol L^{-1} – estocado a temperatura ambiente) e a solução de tampão fosfato (100,0 mmol L^{-1} – estocado a 4 °C). O BGE foi preparado diariamente tomando as respectivas alíquotas das soluções estoques de maneira que a composição e concentração final dos constituintes fosse respectivamente: 15 mmol L^{-1} de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH=6,84), 4 mmol L^{-1} de SDBS, 8,3 mmol L^{-1} de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v n-octanol. Antes da transferência para o vial, o balão volumétrico contendo o BGE foi levado ao banho ultrassônico por 20 minutos para a eliminação de bolhas de ar, estas que dentre outros fatores, podem ser responsáveis pela queda de corrente durante uma corrida eletroforética.

Os padrões analíticos ácido tridecanóico (C13:0), usado como padrão interno (PI), C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2 foram adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). As soluções estoques desses AG foram preparadas em MeOH e estocadas a -20 °C em freezer. As diluições dos estoques para o preparo das misturas de padrão em diferentes concentrações para construção das curvas de calibração foram feitas com MeOH.

Cinco diferentes amostras de lúpulos comerciais em pellets foram utilizadas nesse trabalho. Os lúpulos Amarillo, Chinook, Columbus, Er Golding e Mosaic foram cedidos por doação pela empresa Muller Empório do Malte, localizada na cidade de Juiz de Fora, MG.

6.3.1.2 *Preparo de amostras*

Os mesmos métodos de extração descritos para o GC (subsubseção 6.1.1.2.1) foram testados nessa parte do trabalho e, portanto, não serão descritos novamente. Da mesma forma, os métodos de extração por Hara e Radin (HARA; RADIN, 1978), Bligh e Dyer (BLIGH; DYER, 1959) e Folch e Stanley (JORDI FOLCH; SLOANE STANLEY, 1957) foram avaliados. No entanto, a etapa subsequente à extração contou com uma reação de saponificação para obtenção de sais sódicos de ácidos graxos e não FAMES, como para análise no GC. Para se trabalhar com CZE é necessário que os analitos tenham cargas para que eles possam migrar de maneira diferenciada de acordo com suas respectivas μ_{ep} .

Considerando todos os testes, trabalhou-se com as amostras de lúpulo pulverizadas a partir do uso de almofariz e pistilo de porcelana. Uma massa próxima a 500 mg de lúpulo foi usada para todos os ensaios. Após as extrações pelos três diferentes métodos, os extratos lipídicos foram submetidos as reações de saponificação. Como um quarto teste de preparo de amostras, uma saponificação direta foi avaliada, onde nenhuma etapa prévia de extração seria empregada.

6.3.1.2.1 *Reação de saponificação*

Como etapa prévia a análise no equipamento de CE, a reação de saponificação foi realizada. Considerando os extratos, a amostra utilizada é o conteúdo total da fração lipídica obtida após a evaporação do solvente no rotaevaporador. Portanto ao mesmo balão de extração contendo a fração lipídica é adicionado 2,0 mL de NaOH metanólico (0,5 mol L⁻¹). Para a saponificação direta, 500 mg de lúpulo previamente pulverizado foi pesado em um balão de extração e em seguida adicionado 2,0 mL de NaOH metanólico (0,5 mol L⁻¹). Os balões de extração foram levados ao aquecimento em banho com água com temperatura controlada entre 75 e 80 °C por 25 minutos sob refluxo utilizando hastes de vidro. O banho utilizado tem capacidade para quatro balões de extração,

portanto, sendo possível preparar 4 amostras a cada 25 minutos. O conteúdo saponificado foi transferido para um balão volumétrico de 10,0 mL e aferido com MeOH.

Para a injeção no sistema de CE, diferentes diluições de amostra foram realizadas em balão volumétrico de 1,0 mL. Em todas as análises a adição de PI (C13:0) na concentração de 0,5 mmol L⁻¹ foi feita. Para as quantificações, diluições variando de 20% v/v de amostra a 90% v/v de amostra foram empregadas devido aos diferentes teores de AG presentes nas diferentes amostras, de maneira que a razão de áreas entre o AG e o PI estivesse contemplado pela curva de calibração validada a fim de que a quantificação pudesse ser realizada adequadamente.

6.3.1.3 Parâmetros instrumentais

As análises foram realizadas utilizando um equipamento de CE da marca Agilent modelo 7100 (Palo Alto, USA) equipado com DAD e software para tratamento de dados HP ChemStation (rev A.06.11). O método de CZE empregado foi otimizado em um trabalho prévio do grupo desenvolvido por Barra et al. (2013).

O BGE foi composto de 15,0 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH=6,84), 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS, 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v n-octanol. Os demais parâmetros instrumentais foram: voltagem positiva de 19 kV; injeção no modo hidrodinâmico aplicando 12 mbar/4,0 segundos. Foi usado capilar de sílica fundida revestido externamente com políimida (sigla do inglês, TSP) (Polymicro Technologies, Phoenix, USA) com 48,5 cm de comprimento total e 40,0 cm de comprimento efetivo, diâmetro interno de 75 µm e externo de 375 µm. Considerando um capilar novo, o pré-condicionamento foi: *flush* com solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹ por 1800 s, seguido de água deionizada por 1800 s e BGE por 1800 s. Entre as corridas a limpeza da foi feita aplicando *flush* de 1,0 mol L⁻¹ NaOH (120 s), água deionizada (120 s) e BGE (120 s). Os analitos foram monitorados em 224 nm (± 2,0 nm com taxa de aquisição de 2,5 Hz). O comprimento de onda de 206 nm também foi utilizado para monitorar e auxiliar na identificação de AG poliinsaturados que apresentam absorção suficiente nesse comprimento de onda e podem ser detectados diretamente, ou seja, não necessitam de absorção do cromóforo adicionado ao BGE (SDBS).

6.3.1.4 Validação

Os principais parâmetros de mérito foram avaliados para o método proposto, sendo a RDC 166/2017 (ANVISA, 2017) utilizada para direcionar esse estudo. A linearidade foi investigada pela construção de curvas de calibração com PI (C13:0 – 0,5 mmol L⁻¹) considerando uma preparação experimental com triplicatas genuínas em cinco níveis de concentração (0,1, 0,3, 0,5, 0,7 e 0,9 mmol L⁻¹). As curvas foram estatisticamente validadas checando os pressupostos da análise de variância (ANOVA) como normalidade e homocedasticidade dos resíduos e falta de ajuste. A precisão foi avaliada considerando triplicatas de análise em dois dias consecutivos a fim de calcular a precisão intradia (para o primeiro e segundo dia) e interdia (considerando todas análises), tendo como parâmetro de avaliação o desvio padrão relativo (sigla do inglês, RSD) para razão de áreas e tempos de migração com relação ao PI (analito/PI). A exatidão foi obtida pelo método de adição e recuperação em três níveis de concentração com fortificações sucessivas sobre a matriz da amostra. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados com base no conceito de razão sinal-ruído dados pelas equações

$$LD = \frac{3xs_bxC_s}{H_{max} - H_{min}} \quad (8)$$

$$LQ = \frac{10xs_bxC_s}{H_{max} - H_{min}} \quad (9)$$

onde s_b é o desvio padrão da linha base, C_s é a concentração do padrão analítico, H_{max} é a altura máxima do pico referente ao analito e H_{min} é o nível de linha base referente ao pico tomado.

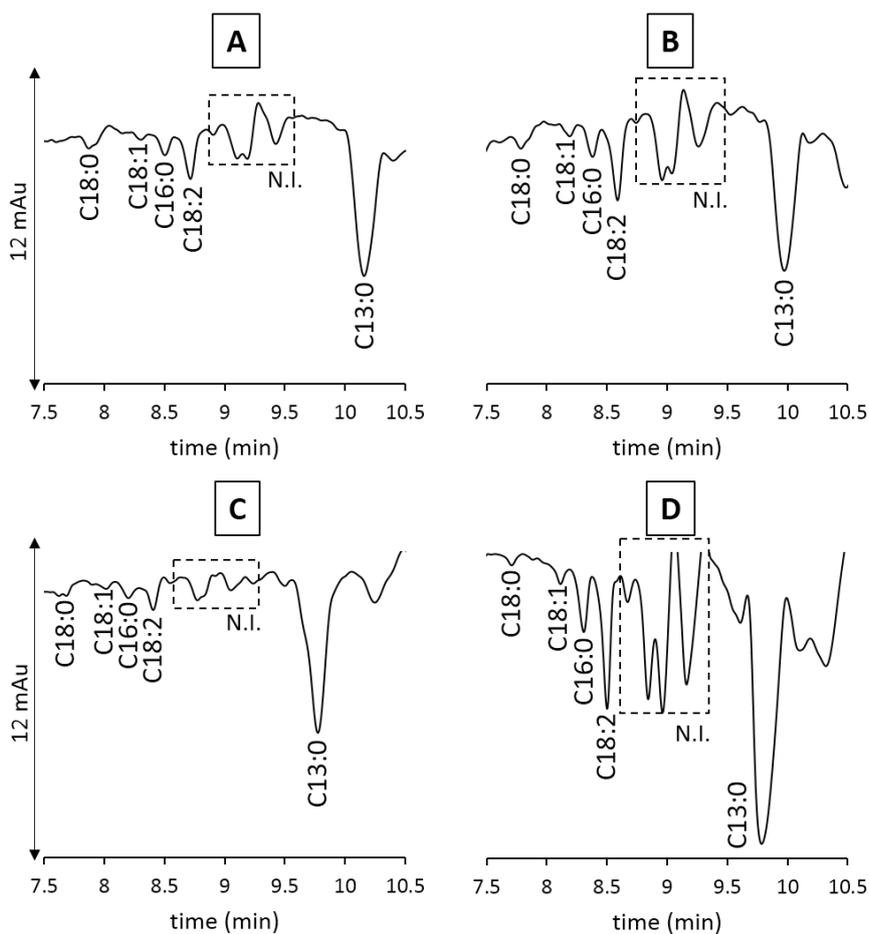
6.3.2 Resultados e discussões

6.3.2.1 Otimização do preparo de amostras

Quatro preparos de amostras foram avaliados, três deles levando em consideração uma etapa prévia de extração seguida de uma reação de saponificação e um deles envolvendo a saponificação direta. O perfil eletroforético de AG no lúpulo de acordo com esses testes podem ser observados na Figura 30. Todos os preparos de amostras foram aplicados com sucesso uma vez que após as análises por CZE das

amostras saponificadas, um perfil eletroforético similar foi obtido, sendo possível identificar os analitos estudados.

Figura 30: Comparação entre os perfis eletroforéticos de AG no lúpulo para os métodos de extração por Hara e Radin (A), Folch e Stanley (B), Bligh e Dyer (C) seguidos de saponificação e para a saponificação direta (D). Os principais parâmetros para o método por CZE foram: BGE composto de 15 mmol L⁻¹ de tampão NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 6,86), 4 mmol L⁻¹ de SDBS, 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v n-octanol; temperatura do cartucho de 25 °C; voltagem positiva de 19 kV; injeção hidrodinâmica de 12 mbar/4,0 s; capilar de TSP (48,5 cm e 40,0 cm de comprimento total e efetivo respectivamente – 75 µm i.d e 375 µm o.d.); detecção em 224 nm (± 2,0 nm taxa de aquisição de 2,5 Hz)



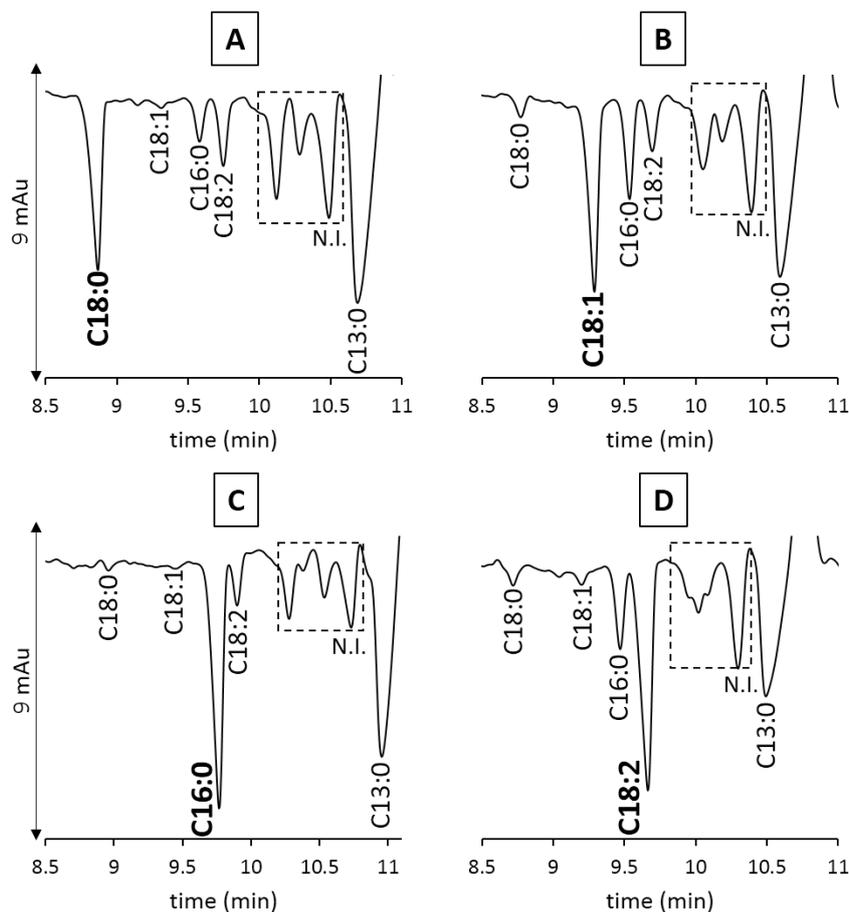
Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Comparando os três métodos de extração, a abordagem pelo procedimento de Folch e Stanley foi responsável pela obtenção da maior massa de extrato lipídico (63,3 mg), seguido das abordagens por Hara e Radin (44,9 mg) e Bligh e Dyer (9,5 mg), o que é refletido nos eletroferogramas da Figura 30 e pode ser confirmado pela comparação visual dos tamanhos de picos referentes aos analitos. No entanto, a saponificação direta (Figura 30 D) forneceu o melhor perfil eletroforético dos AG no lúpulo, visto que os picos dos analitos estão mais evidentes e apresentando maiores áreas. Nesse sentido, a abordagem mais adequada para o preparo de amostras do lúpulo com intuito de uma análise no CE foi definida por meio da saponificação direta.

A identificação de C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2 foi feita fortificando uma amostra de lúpulo com os padrões analíticos referentes aos analitos estudados, cujos resultados são apresentados na Figura 31. Os eletroferogramas do lúpulo fortificado com os padrões de C18:0 (Figura 31 A), C18:1 (Figura 31 B), C16:0 (Figura 31 C) e C18:2 (Figura 31 D) apontam para a confirmação dos AG de acordo com o aumento das respectivas áreas. Outro importante e amplamente discutido ponto para a análise de AG negativamente carregados por CZE em contra-fluxo, é que a μ_{apa} é maior para o AG com menor μ_{ele} devido a menor resistência que o analito oferece ao EOF, cuja mobilidade é dada por μ_{eof} . Essa discussão permite explicar o motivo do C18:0 migrar mais rapidamente e ser detectado primeiro que o C16:0. Para o caso dos AG insaturados, a discussão é um pouco mais complexa devido ao dobramento da cadeia carbônica por conta das insaturações, o que implica diretamente na magnitude da μ_{ep} uma vez que essa grandeza é dependente do raio da espécie solvatada em meio ao BGE, dada pela grandeza r .

Além dos AG identificados, existe uma região dos eletroferogramas (marcada com um retângulo pontilhado) com AG não identificados (N.I.). Possivelmente, AG poliinsaturados, como o C18:3 (ácido linolênico), estão presentes nessa região. Avaliando o eletroferograma em 206 nm é possível perceber os picos nessa região se voltando para cima (com aspecto de comigração), o que também reforça a possibilidade da presença de outros AG poliinsaturados, visto que eles podem ser detectados diretamente; eletroferogramas não mostrados. No entanto, a ênfase desse trabalho como uma primeira abordagem envolvendo a aplicação de um método por CE para a determinação de AG em amostras de lúpulo é na identificação e quantificação de C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2.

Figura 31: Confirmação dos AG C18:0 (A), C18:1 (B), C16:0 (C) e C18:2 (D) em uma amostra de lúpulo pela fortificação com padrões analíticos destacados em negrito. Condições eletroforéticas: as mesmas apresentadas na Figura 30. N.I. se referem aos AG não identificados



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

6.3.2.2 Validação

Os principais parâmetros de validação para um método analítico foram investigadas (ANVISA, 2017). Supondo que os teores de AG em lúpulos poderiam ser baixos, os primeiros parâmetros avaliados foram o LD e LQ a fim de que fosse definido o primeiro nível de concentração da curva de calibração. LD e LQ foram calculados pelas equações 8 e 9, utilizando as informações necessárias obtidas a partir da análise de uma mistura de padrões contendo $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$ de C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2. Os valores de LD variaram de 0,03 a $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$, enquanto que os valores de LQ variaram de $0,07 \text{ mmol L}^{-1}$ (para o C16:0) a $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ (para o C18:0) como

mostrado na Tabela 19. Assim, $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ foi tomado como primeiro nível da curva de calibração para todos os AG e a faixa de concentração estudada em 5 níveis foi dada pelas concentrações 0,1, 0,3, 0,5, 0,7 e $0,9 \text{ mmol L}^{-1}$.

A linearidade foi avaliada construindo curvas de calibração para cada analito por modelagem de regressão por mínimos quadrados ordinários com a abordagem de padronização interna, onde as informações instrumentais (área) e de concentração do PI são utilizadas como fator de normalização para as informações do analito estudado. Os principais resultados estão disponíveis na Tabela 19. Para todos os AG estudados, os valores do coeficiente de determinação (R^2) foram superiores a 0,9979 e os modelos lineares não apresentaram falta de ajuste ao nível de 95% de confiança, visto que todos os valores de F calculado (F_{cal}) foram menores que os valores de F crítico (F_{crit} – (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2001)). Os resíduos da regressão apresentaram distribuição normal e foram homocedásticos, visto que os testes de Ryan-Joiner (semelhante ao Shapiro-Wilk) e de Levene, respectivamente, apresentaram p-valor superiores à significância dos testes ($p\text{-valor} > 0,05$). Adicionalmente, para todos os analitos, as regressões foram significativas, visto que o valores de F_{calc} foram muito superiores ao F_{crit} (3 ordens de grandeza superiores), sendo que um valor ao menos de 5 vezes maior é requerido.

Tabela 19: Resultados compilados para o teste de linearidade e LD e LQ

	C18:0	C18:1	C16:0	C18:2
R ²	0,9989	0,9979	0,9992	0,9986
Equação	y=0,2381x-0,0043 ^a	y=0,2925x-0,0053	y=0,3387x-0,0023	y=0,3106x-0,0053
Normalidade ^b	p-valor > 0,1	p-valor > 0,1	p-valor > 0,1	p-valor > 0,1
Falta de ajuste ^c	F _{calc} =2,68 < F _{tab} =3,86	F _{calc} =0,14 < F _{tab} =3,71	F _{calc} =1,13 < F _{tab} =3,71	F _{calc} =1,98 < F _{tab} =4,07
Significância da regressão	F _{calc} =10699 > F _{tab} =4,74	F _{calc} =6317 > F _{tab} =4,67	F _{calc} =15972 > F _{tab} =4,67	F _{calc} =8034 > F _{tab} =4,84
Homocedasticidade ^d	p-valor = 0,93	p-valor = 0,39	p-valor = 0,77	p-valor = 0,85
LD ^e (mmol L ⁻¹)	0,03	0,03	0,02	0,03
LQ ^f (mmol L ⁻¹)	0,10	0,09	0,07	0,09

^a Regressão linear obtida por mínimos quadrados ordinários | ^b Normalidade nos resíduos avaliada pelo teste de Ryan-Joiner com 95% de confiança | ^c Falta de ajuste pela ANOVA - Graus de liberdade: Regressão=1 para todos AG; Residual (C18:0=12; C18:1=13; C16:0=13; C18:2=11); Falta de ajuste=3 para todos AG; Erro puro (C18:0=9; C18:1=10; C16:0=10; C18:2=8) | ^d Homocedasticidade nos resíduos pelo teste de Levene com 95% de confiança | ^{e,f} LD e LQ calculado pela razão sinal ruído por meio das equações 8 e 9 | A faixa de calibração avaliada contou com níveis de concentração de 0,1 a 0,9 mmol L⁻¹ para todos analitos.

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A precisão do método foi estudada pela avaliação do RSD levando em consideração a razão entre as informações do analito e do PI (C13:0) para tempos de migração e área. A Tabela 20 mostra os valores de RSD para os testes de precisão intradia em dois dias consecutivos. É importante ressaltar que o uso de PI é essencial para determinação de AG em lúpulos por CE, visto que nas avaliações sem o PI os valores de RSD foram muito discrepantes, gerando elevados valores de RSD. Os valores de RSD para as razões de tempo de migração foram muito baixos para os testes intradia nos dois dias consecutivos. Os valores de RSD variaram de 0,03% para C16:0/C13:0 (intradia 1) a 0,14% para C18:0/C13:0 (intradia 1). Para a razão das áreas, o mais baixo valor de RSD foi de 2,90% para C16:0/C13:0 (intradia 1), enquanto que o mais elevado foi de 5,32% para C18:0/C13:0 (intradia 1).

Tabela 20: Avaliação da precisão do método considerando injeções de réplicas intradia e interdia para razão de tempo de migração e área para todos analitos.

Intradia 1								
	C18:0/C13:0		C18:1/C13:0		C16:0/C13:0		C18:2/C13:0	
Injeção	Área	Tempo	Área	Tempo	Área	Tempo	Área	Tempo
1	0,018	0,797	0,027	0,830	0,056	0,845	0,224	0,869
2	0,017	0,795	0,028	0,830	0,058	0,845	0,241	0,870
3	0,016	0,797	0,026	0,830	0,055	0,845	0,226	0,871
RSD (%)	5,32	0,14	4,03	0,04	2,90	0,03	4,13	0,10
Intradia 2								
	C18:0/C13:0		C18:1/C13:0		C16:0/C13:0		C18:2/C13:0	
Injeção	Área	Tempo	Área	Tempo	Área	Tempo	Área	Tempo
1	0,023	0,782	0,023	0,822	0,080	0,841	0,309	0,863
2	0,024	0,783	0,023	0,823	0,081	0,842	0,319	0,863
3	0,022	0,784	0,025	0,824	0,075	0,842	0,328	0,864
RSD (%)	5,04	0,12	3,95	0,11	4,34	0,07	2,95	0,08

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A exatidão foi acessada pelo teste de adição e recuperação com fortificações em três níveis de concentrações sucessivas sobre a matriz de lúpulo saponificada utilizando padrões analíticos de AG (0,25, 0,50 e 0,75 mmol L⁻¹). Após as análises da amostra com suas respectivas fortificações pelo método de CZE, os cálculos para quantificação foram

feitos utilizando as curvas de calibração estatisticamente validadas e os resultados estão disponíveis na Tabela 21. Como os AG estão presentes em diferentes concentrações nas amostras de lúpulo, diferentes diluições foram necessárias para que os analitos tanto na amostra sem fortificação, quanto para a fortificação com maior concentração de padrão (nível 3) fosse contemplada pela faixa de calibração validada e pudesse ser apropriadamente quantificada pela curva. Sendo assim, para o C18:0 e C18:1 a amostra saponificada de lúpulo Er Golding com diluição de 50% v/v foi utilizada, enquanto que para C16:0 essa mesma amostra foi diluída considerando 20% v/v de amostra, devido a comigração que começa a surgir entre C16:0 e C18:2 quando amostras mais concentradas são empregadas. Para o C18:2, decidiu-se trabalhar com outra amostra de lúpulo, devido ao elevado teor desse analito na amostra de lúpulo Er Golding, o que tornaria necessária uma grande diluição da amostra para que a fortificação com maior concentração de padrão pudesse ser quantificada pela curva, mas que em contrapartida, devido a elevada diluição, pouca matriz de lúpulo saponificado ficaria na amostra final, o que poderia descaracterizar o ensaio. Nesse sentido, utilizou-se a amostra de lúpulo saponificada Columbus com diluição de 50% v/v para o ensaio de adição e recuperação com objetivo de investigar a exatidão do C18:2.

Para os AG C16:0 e C18:2 uma diluição para 50% v/v de amostra foi suficiente para que não houvesse comigração dos analitos e para que as razões de áreas analito/PI fossem contempladas pela curva validada. Já para C18:0 e C18:1 essa mesma diluição não foi suficiente pois a razão de áreas analito/PI ficou abaixo do LQ (primeiro ponto da curva), não podendo ser quantificada. Sendo assim, para C18:0 e C18:1 uma diluição considerando 75% de amostra foi feita para os ensaios de exatidão. As recuperações foram satisfatórias, variando de 81% a 106% para C16:0.

Tabela 21: Exatidão obtida por adição e recuperação em três níveis sucessivos de concentração para C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2

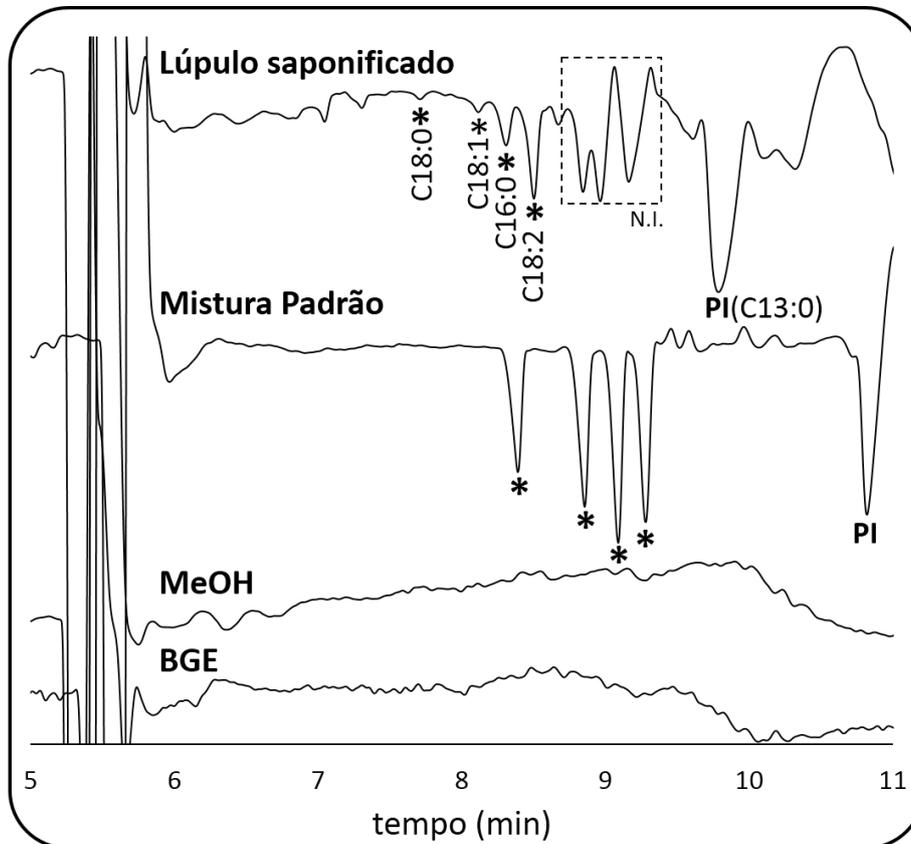
	C18:0 (mmol L ⁻¹)	C18:1 (mmol L ⁻¹)	C16:0 (mmol L ⁻¹)	C18:2 (mmol L ⁻¹)
Lúpulo	0,20	0,26	0,14	0,25
Fortificação ^a 1	0,41	0,54	0,40	0,51
Fortificação 2	0,68	0,77	0,67	0,71
Fortificação 3	0,89	0,90	0,90	0,89
	Recuperação% C18:0	Recuperação% C18:1	Recuperação% C16:0	Recuperação% C18:2
	-	-	-	-
	85	110	106	107
	96	103	108	93
	92	85	102	86

^a As fortificações foram feitas com padrão nas concentrações de 0,25 (1), 0,50 (2) e 0,75 (3) mmol L⁻¹

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

A seletividade do método foi avaliada pela comparação das injeções de BGE, MeOH (solvente utilizado em todas as preparações), uma mistura de padrão na concentração de 0,7 mmol L⁻¹ de C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2 e uma amostra de lúpulo saponificada. Observando a Figura 32, o tempo do fluxo eletrosmótico, bem como seu perfil (região eletroforética entre 5 e 6 minutos), é muito semelhante para todas as injeções. Considerando as análises do BGE e do MEOH, nenhum sinal além do EOF foi encontrado. Considerando a mistura de padrões, quatro picos referentes aos analitos, além do pico do PI, foram facilmente identificados, sendo esses marcados por um asterisco preto para comparação com o resultado da análise para a amostra. No eletroferograma da amostra de lúpulo saponificada diretamente, os picos dos AG foram nomeados e também marcados com asteriscos pretos para realizar uma correlação com a análise da mistura de padrões. Além disso, outro ponto interessante a ser destacado é o deslocamento para tempos de migração menores dos picos dos AG no eletroferograma da amostra quando comparado com a da mistura de padrões, um efeito que pode estar relacionado ao efeito de matriz, mas também a alguma variação instrumental. No entanto, se tem certeza dos AG na amostra quando retomado o estudo com fortificação dos AG individuais, como mostrado na Figura 31.

Figura 32: Teste de seletividade pela injeção de BGE, MeOH, mistura de C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2 (0,7 mmol L⁻¹) e uma amostra de lúpulo saponificada. As condições eletroforéticas são as mesmas descritas na Figura 30.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

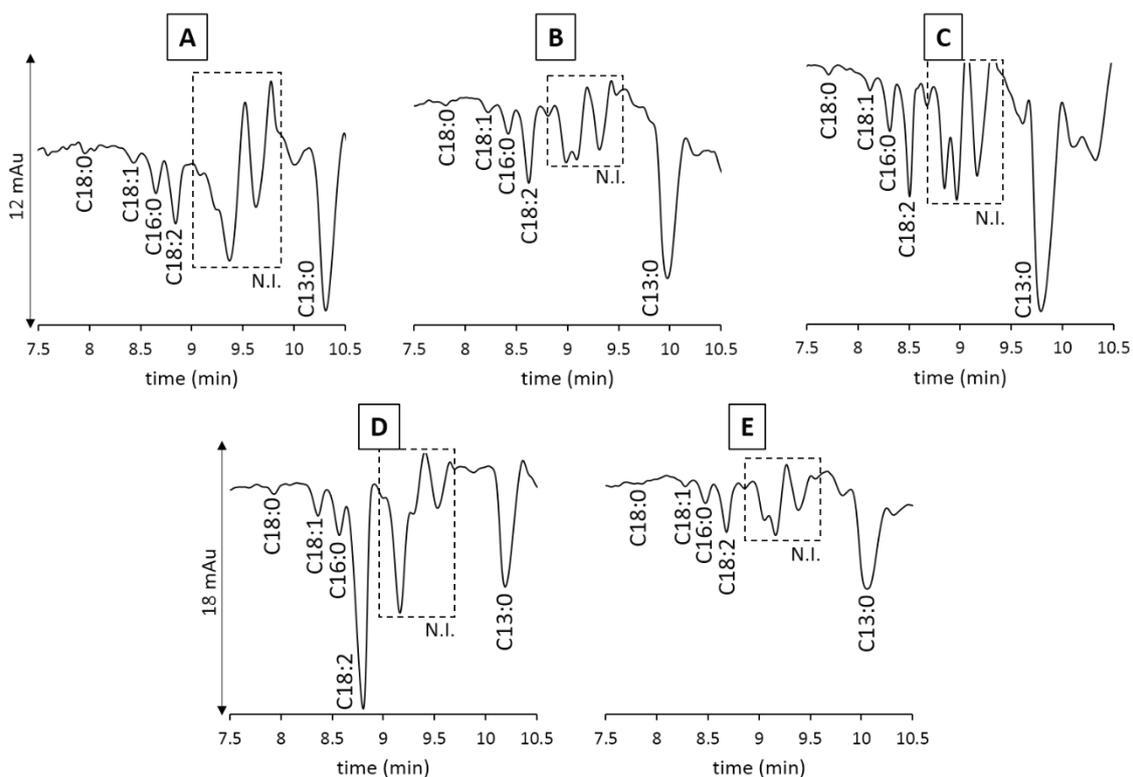
6.3.2.3 Aplicação do método validado a diferentes amostras de lúpulo

Com o método analítico validado para a aplicação em amostras de lúpulo, a abordagem geral foi aplicada para determinar C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2 em diferentes amostras de lúpulo. Os coeficientes angulares e lineares das curvas validadas foram usados como preditores para obtenção das novas concentrações dos analitos nas amostras após a realização da saponificação direta e análise por CZE.

Da mesma forma que na concentração das curvas de calibração, todas amostras contaram com a adição de 0,5 mmol L⁻¹ de PI (C13:0). Amarillo, Chinook, Columbus, Er Golding e Mosaic foram as amostras de lúpulo avaliadas. O perfil eletroforético dos AG nos diferentes lúpulos foram similares, variando basicamente as áreas dos AG como pode ser visto na Figura 33. Todos eletroferogramas mostrados na Figura 33 foram obtidos a partir de diluições para 50% v/v das amostras saponificadas. Na Tabela 22 estão disponíveis duplicatas dos teores dos AG de cada lúpulo avaliado. Considerando o

lúpulo Amarello, em sua segunda réplica o pico referente ao C18:0 não pôde ser integrado e seu resultado foi reportado como “Abaixo do LD”. Para a amostra Chinook, C18:0 e C18:1 foram identificados, mas não quantificados (“Abaixo do LQ”) devido a razão de áreas analito/PI estar abaixo do primeiro ponto da curva de calibração validada, sendo esse ponto o LQ. O mesmo resultado foi obtido para o C18:1 no lúpulo Columbus. Para os outros lúpulos, C18:0 e C18:1 apresentaram menores concentrações, enquanto que C16:0 e C18:2 apresentaram concentrações mais elevadas, sendo o C18:2 o AG majoritário. Os valores de RSD para as duplicatas foram baixos, variando de 0,33% para o C16:0 (Chinook) a 6,57% para o C18:0 (Er Golding).

Figura 33: Perfil eletroforético dos AG de cinco diferentes variedades de lúpulos: (A) Amarello; (B) Chinook; (C) Columbus; (D) Er Golding (E) e (F) Mosaic. As condições eletroforéticas foram as mesmas descritas na Figura 30.



Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

Tabela 22: Quantificação em duplicata de C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2 em cinco diferentes variedade de lúpulo (Amarillo, Chinook, Columbus, Er Golding e Mosaic) por CZE-DAD

	C18:0 (g/100g) ^a	RSD%	C18:1 (g/100g) ^a	RSD%	C16:0 (g/100g) ^b	RSD%	C18:2 (g/100g) ^b	RSD%
Amarillo 1	0,11		0,07		0,18		0,56	
Amarillo 2	Abaixo do LD	-	0,07	0,79	0,18	1,05	0,57	0,36
Chinook 1	Abaixo do LQ		Abaixo do LQ		0,15		0,53	
Chinook 2	Abaixo do LQ	-	Abaixo do LQ	-	0,15	0,33	0,52	1,01
Columbus 1	0,11		Abaixo do LQ		0,21		0,59	
Columbus 2	0,11	3,77	0,28	-	0,21	2,09	0,59	0,48
Er Golding 1	0,10		0,19		0,26		1,90 ^c	
Er Golding 2	0,10	6,57	0,18	2,55	0,26	1,41	1,93	0,93
Mosaic 1	0,12		0,07		0,21		0,61	
Mosaic 2	0,12	1,93	0,07	1,61	0,20	3,44	0,61	0,54

^a Considerando diluição com 75% de amostra

^b Considerando diluição com 50% de amostra

^c Considerando diluição com 75% de amostra

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR

6.3.3 Conclusão

Nessa parte do trabalho, C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2 foram determinados em amostras de lúpulos por CZE-DAD empregando um simples método de preparo de amostras. Dentro da pesquisa bibliográfica feita, nenhum trabalho envolvendo esse tipo abordagem foi feita, sendo esse trabalho o primeiro a propor a determinação de AG por CE. Quatro diferentes métodos de preparo de amostras foram comparados, sendo três deles envolvendo uma etapa prévia de extração seguida da reação de saponificação e uma outra envolvendo a reação de saponificação diretamente no lúpulo pulverizado. Os analitos foram identificados com sucesso e o método por CZE para análise de lúpulos foi devidamente validado levando em consideração os principais parâmetros de validação. Linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão intradia e interdia, exatidão e seletividade foram os testes realizados para validação do método. O método foi adequado para determinação de C18:0, C18:1, C16:0 e C18:2 em amostras de lúpulo, o que torna essa metodologia interessante para pesquisadores de diferentes áreas

do conhecimento científico, como a botânica, a fitoquímica, bem como para produtores de lúpulo e principalmente para a indústria cervejeira. A metodologia proposta é rápida, trabalha com pequenos volumes de solvente e não requer colunas específicas

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nesse documento foram abordados desenvolvimentos e aplicações de metodologias analíticas para identificação, quantificação e estudo dos principais metabólitos biosintetizados no lúpulo que desempenham importantes papéis no processo de produção de cerveja. Diferentes métodos de preparo de amostras, técnicas analíticas e abordagens estatísticas uni e multivariadas foram empregadas para estudar os principais metabólitos do lúpulo.

Os α e β -ácidos foram estudados empregando dois modos de eletroforese capilar, sendo que na primeira parte, por CZE-UV, foram separados quatro compostos e foi utilizado o perfil eletroforético para classificação dos lúpulos, enquanto que para separação total de todos os isômeros e homólogos de α e β -ácidos lançou-se mão do modo CD-MEKC-UV. O perfil terpênico de diferentes variedades de lúpulos foi acessado por meio de um método simples de extração direta com solvente assistido por ultrassom e análise direta no sistema de GC-MS. De posse dos perfis terpênicos com diferentes teores dos mesmos constituintes foi avaliada a relação desses perfis com as características de aroma e amargor dos diferentes lúpulos comerciais. A composição dos ácidos graxos no lúpulo foi avaliada por GC-FID, sendo que os AG C17:1(cis-10), o C20:2(cis-11,14) e o C22:2(cis-13,16) foram identificados pela primeira vez em lúpulos. As informações do GC-FID também foram usadas como referência para a construção de modelos de calibração multivariada por ^1H NMR/siPLS para os ácidos graxos C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C20:1, C20:2 e C22:2. Além disso, para os quatro AG C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 foi proposta e validada uma metodologia mais simples empregando saponificação direta e análise por CZE-UV.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th. ed. [s.l.] Allured Publilshing Corporation, 2007.
- ALMAGUER, C. et al. Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289–314, 2014.
- ANDERSEN, C. M.; BRO, R. Variable selection in regression-a tutorial. **Journal of Chemometrics**, v. 24, n. 11–12, p. 728–737, 2010.
- ANDERSSON, M. A comparison of nine PLS1 algorithms. **Journal of Chemometrics**, v. 23, p. 518–529, 2009.
- ANVISA. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166/2017**. [s.l.: s.n.].
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green Analytical Chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 497–511, 2008.
- ARRÁEZ-ROMÁN, D. et al. Characterization of the methanolic extract of hops using capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry. **Electrophoresis**, v. 27, n. 11, p. 2197–2207, 2006.
- ASLAN, N.; CEBECI, Y. Application of Box-Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. **Fuel**, v. 86, n. 1–2, p. 90–97, 2007.
- BALABIN, R. M.; SMIRNOV, S. V. Variable selection in near-infrared spectroscopy: Benchmarking of feature selection methods on biodiesel data. **Analytica Chimica Acta**, v. 692, n. 1–2, p. 63–72, 2011.
- BARNES, R. J.; DHANOA, M. S.; LISTER, S. J. Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. **Applied Spectroscopy**, v. 43, n. 5, p. 772–777, 1989.
- BERNOTIENĒ, G. et al. Chemical composition of essential oils of hops (*Humulus lupulus* L.) growing wild in Aukstaitija. **Chemija**, v. 15, n. 2, p. 31–36, 2004.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 21, p. 911–917, 1959.
- BRASIL, G. DO. **Brasil é o terceiro no ranking mundial de produção de cerveja**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/08/brasil-e-o-terceiro-no-ranking-de-producao-mundial-de-cerveja>>. Acesso em: 20 out. 2018.
- BRAVI, E. et al. Determination of free fatty acids in beer. **Food Chemistry**, v. 215, p. 341–346, 2017.
- BRERETON, R. G. **Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. 1. ed. England: [s.n.]. v. 8
- CARRINGTON, B. R. et al. Gushing promoters and suppressants in beer and hops. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 78, n. d, p. 243–254, 1972.
- CESLOVÁ, L. et al. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7249–57, out. 2009.
- CHADWICK, L. R.; PAULI, G. F.; FARNSWORTH, N. R. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. **Phytomedicine**, v. 13, p. 119–131, 2006.
- CHELLINI, P. R. et al. Simultaneous determination of rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol in 4-FDC tablet by Raman spectroscopy associated to chemometric approach. **Vibrational Spectroscopy**, v. 90, p. 14–20, 2017.
- CHRISTIE, W. W. Preparation of Methyl Esters. In: THE OILY PRESS LTD (Ed.). . **Advances**

in **Lipid Methodology - Two**. [s.l: s.n.]. p. 69–111.

CHRISTIE, W. W. Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis. In: **Advances in Lipid Methodology - Two**. [s.l: s.n.]. p. 69–111.

CIFUENTES, A.; POPPE, H. Effect of pH and ionic strength of running buffer on peptide behavior in capillary electrophoresis: Theoretical calculation and experimental evaluation. **Electrophoresis**, v. 16, n. 1, p. 516–524, 1995.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7.ed. ed. Campinas: [s.n.].

CORTACERO-RAMÍREZ, S. et al. Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 7–8, p. 440–445, 2003.

CULIK, J. et al. Extraction of Bitter Acids from Hops and Hop Products Using Pressurized Solvent Extraction (PSE). **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 3, p. 220–225, 2009.

DE CASTRO BARRA, P. M. et al. An alternative method for rapid quantitative analysis of majority cis-trans fatty acids by CZE. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 33–41, 2013.

DE COOMAN, L.; EVERAERT, E.; DE KEUKELEIRE, D. Quantitative analysis of hop acids, essential oils and flavonoids as a clue to the identification of hop varieties. **Phytochemical Analysis**, v. 9, n. 3, p. 145–150, 1998.

DEEB, S. EL; IRIBAN, M. A.; GUST, R. MEKC as a powerful growing analytical technique. **Electrophoresis**, v. 32, n. 1, p. 166–183, 2011.

DELYSER, D. Y.; KASPER, W. J. Hopped Beer: The Case For Cultivation. **Economic Botany**, v. 48, n. 2, p. 166–170, 1994.

DEMIREVA, N. Z.; TOTOYA, P. F. STUDIES ON THE FATTY ACID COMPOSITION OF HOP EXTRACT. **J. Inst. Brew**, v. I, p. 437–438, 1995.

DUARTE, L. M. et al. Determination of some physicochemical properties in Brazilian crude oil by ¹H NMR spectroscopy associated to chemometric approach. **Fuel**, v. 181, 2016.

DUARTE, L. M. et al. Simultaneous determination of aspartame, cyclamate, saccharin and acesulfame-K in powder tabletop sweeteners by FT-Raman spectroscopy associated with the multivariate calibration: PLS, iPLS and siPLS models were compared. **Food Research International**, v. 99, 2017a.

DUARTE, L. M. et al. Study of Distillation Temperature Curves from Brazilian Crude Oil by ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Association with Partial Least Squares Regression. **Energy and Fuels**, v. 31, n. 4, 2017b.

DUARTE, L. M.; ADRIANO, L. H. C.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Capillary electrophoresis in association with chemometrics approach for bitterness hop (*Humulus lupulus* L.) classification. **Electrophoresis**, v. 39, p. 1399–1409, 2018.

ENGEL, J. et al. Breaking with trends in pre-processing? **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 50, p. 96–106, 2013.

EUROPEAN BREWING CONVENTION. **Hops and Hop Products, Manual of Good Practice**. [s.l: s.n.].

FARAG, M. A. et al. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): A comparison of MS and NMR methods in metabolomics. **Metabolomics**, v. 8, n. 3, p. 492–507, 2012.

FARAG, M. A. et al. Classification of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop) by chemometric pixel analysis of two dimensional nuclear magnetic resonance spectra. **Metabolomics**, v. 10, n. 1, p. 21–32, 2014.

FORMATO, A. et al. Supercritical fluid extraction of α - And β -acids from hops compared to

- cyclically pressurized solid-liquid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 84, p. 113–120, 2013.
- GARCÍA-PÉREZ, I. et al. Metabolic fingerprinting with capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1204, n. 2, p. 130–139, 2008.
- GEMPERLINE, P. **Practical guide to chemometrics**. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press, 2006.
- GONÇALVES, J. et al. Headspace solid-phase microextraction combined with mass spectrometry as a powerful analytical tool for profiling the terpenoid metabolomic pattern of hop-essential oil derived from Saaz variety. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 17, p. 2282–2296, 2012.
- HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, n. 1, p. 420–426, 1978.
- HASELEU, G.; INTELMANN, D.; HOFMANN, T. Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from β -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 71–81, 2009.
- HENRY, G. E. et al. Antioxidant and cyclooxygenase activities of fatty acids found in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 8, p. 2231–2234, 2002.
- HIROYUKI, N.; TERABE, S. Micellar electrokinetic chromatography Perspectives in drug analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 735, n. 1–2, p. 3–27, 1996.
- HOFTE, A. J. P.; HOEVEN, R. A. M. VAN DER. Characterization of Hop Acids by Liquid Chromatography with Negative Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, v. 56, n. 3, p. 118–122, 1998.
- HOR, T. S. et al. Analysis of Free Fatty Acids in Beer: Comparison of Solid-Phase Extraction, Solid-Phase Microextraction, and Stir Bar Sorptive Extraction. **J. Agric. Food Chem**, v. 57, p. 11081–11085, 2009.
- HUANG, Y. S. et al. Eicosadienoic acid differentially modulates production of pro-inflammatory modulators in murine macrophages. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 358, n. 1–2, p. 85–94, 2011.
- ISMAIL, S. et al. Chemical Composition and Antibacterial and Cytotoxic Activities of *Allium hirtifolium* Boiss. **BioMed Research International**, v. 2013, p. In Press., 2013.
- JASKULA-GOIRIS, B.; GUIDO, L. D. C. A. Hop α -acids isomerisation and utilisation: An experimental review. **Cerevisia**, v. 35, n. October, p. 57–70, 2010.
- JASKULA, B. et al. Enhanced Quantitative Extraction and HPLC Determination of Hop and Beer Bitter Acids. **Journal Of The Institute Of Brewing**, v. 113, n. 4, p. 381–390, 2007.
- JASKULA, B.; AERTS, G.; DE COOMAN, L. Potential impact of medium characteristics on the isomerisation of hop α -acids in wort and buffer model systems. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1219–1226, 2010.
- JORDI FOLCH, M. L.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem**, v. 226, p. 497–509, 1957.
- JORGE, K.; TRUGO, L. C. Discrimination of different hop varieties using headspace gas chromatographic data. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 411–415, 2003.
- KALIDASU, G. et al. Secondary volatiles and metabolites from *Nigella sativa* L. seed. **Indian Journal of Natural Products and Resources**, v. 8, n. 2, p. 151–158, 2017.
- KAO, T. H.; WU, G. Y. Simultaneous determination of prenylflavonoid and hop bitter acid in beer lee by HPLC-DAD-MS. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1218–1226, 2013.
- KARABIBER, F. A Peak Alignment Algorithm With Novel Improvements in Application To

- Electropherogram Analysis. **Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 11, n. 05, p. 1350011, 2013.
- KAVALIER, A. R. et al. Phytochemical and morphological characterization of Hop (*Humulus lupulus* L.) cones over five developmental stages using high performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, ultrahigh performance liquid chromatography photodiode. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4783–4793, 2011.
- KAVANAUGH, T. E. et al. TRACE VOLATILE CONSTITUENTS OF BEER - HOP SEED OIL. **J. Inst. Brew**, v. 81, p. 314–317, 1975.
- KENNARD, R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. **Technometrics**, v. 11, n. 1, p. 137–148, 1969.
- KHATIB, A. et al. Isolation of individual hop iso- α -acids stereoisomers by β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 354–357, 2010.
- KILLEEN, D. P. et al. Vibrational spectroscopy and chemometrics for rapid, quantitative analysis of bitter acids in hops (*Humulus lupulus*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 52, p. 12521–12528, 2014.
- KILLEEN, D. P. et al. Fast Sampling, Analyses and Chemometrics for Plant Breeding: Bitter Acids, Xanthohumol and Terpenes in Lupulin Glands of Hops (*Humulus lupulus*). **Phytochemical Analysis**, v. 28, n. 1, p. 50–57, 2017.
- KISHIMOTO, T. et al. Analysis of hop-derived terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4701–4707, 2005.
- KITSON, F. G.; LARSEN, B. S.; MCEWEN, C. N. **Gas chromatography and mass spectrometry- a practical guide**. [s.l.: s.n.].
- KOK, M. G. M. et al. Hydrophilic interaction chromatography-mass spectrometry for anionic metabolic profiling of urine from antibiotic-treated rats. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 92, p. 98–104, 2014.
- KORNYSOVA, O. et al. Capillary zone electrophoresis method for determination of bitter (alpha- and beta-) acids in hop (*Humulus lupulus* L.) cone extracts. **Advances in Medical Sciences**, v. 54, n. 1, p. 41–46, 2009.
- KOVÁTS, E. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. **Helvetica Chimica Acta**, v. 41, n. 7, p. 1915–1932, 1958.
- KUCK, L. S. **Cerveja : Sabor e Aroma**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2008.
- LEARDI, R. Genetic algorithms in chemometrics and chemistry: A review. **Journal of Chemometrics**, v. 15, n. 7, p. 559–569, 2001.
- LEE, J. H. et al. Supercritical fluid extracts of *Moringa oleifera* and their unsaturated fatty acid components inhibit biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **Food Control**, v. 80, p. 74–82, 2017.
- LEE, L. C.; LIONG, C. Y.; JEMAIN, A. A. A contemporary review on Data Preprocessing (DP) practice strategy in ATR-FTIR spectrum. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 163, n. December 2016, p. 64–75, 2017.
- LEONARDI, M. et al. Characterisation of four popular Polish hop cultivars. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 1770–1774, 2013.
- LI, N. et al. Fatty Acid and Lipid Transport in Plant Cells. **Trends in Plant Science**, v. 21, n. 2, p. 145–158, 2016.
- LIGOR, M. et al. Comparative Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Evaluation of Hop (*Humulus lupulus* L.) Essential Oils and Extracts Obtained Using Different Sample Preparation

- Methods. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 7, p. 1433–1442, 2014.
- MALLI, B.; NATSCHLÄGER, T. Fused stagewise regression — A waveband selection algorithm for spectroscopy. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 149, p. 53–65, 2015.
- MASEK, A. et al. Characteristics of compounds in hops using cyclic voltammetry, UV-VIS, FTIR and GC-MS analysis. **Food Chemistry**, v. 156, p. 353–361, 2014.
- MASSART, D. L. et al. **Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A**. [s.l.: s.n.].
- MEHMOOD, T. et al. A review of variable selection methods in Partial Least Squares Regression. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 118, n. August, p. 62–69, 2012.
- MOIR, M. et al. The Science of Beer Hops - A Millennium Review Hops - A Millennium Review. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, v. 58, n. 4, p. 131–146, 2018.
- MONAKHOVA, Y. B.; TSIKIN, A. M.; MUSHTAKOVA, S. P. Processing of NMR, UV, and IR spectrometric data prior to chemometric simulation by independent component and principal component analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 71, n. 6, p. 554–560, 2016.
- MONGELLI, A. et al. Are *Humulus lupulus* L. ecotypes and cultivars suitable for the cultivation of aromatic hop in Italy? A phytochemical approach. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 693–700, 2016.
- MORGAN, N. G.; DHAYAL, S. Unsaturated fatty acids as cytoprotective agents in the pancreatic B-cell. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 82, n. 4–6, p. 231–236, 2010.
- NEVEDOMSKAYA, E. et al. Alignment of capillary electrophoresis-mass spectrometry datasets using accurate mass information. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 8, p. 2527–2533, 2009.
- NIELSEN, N. P. V.; CARSTENSEN, J. M.; SMEDSGAARD, J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. **Journal of Chromatography A**, v. 805, n. 1–2, p. 17–35, 1998.
- NØRGAARD, L. et al. Interval partial least-squares regression (iPLS): A comparative chemometric study with an example from near-infrared spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 3, p. 413–419, 2000a.
- NØRGAARD, L. et al. Interval Partial Least-Squares Regression (iPLS): A Comparative Chemometric Study with an Example from Near-Infrared Spectroscopy Interval Partial Least-Squares Regression (i PLS): A Comparative Chemometric Study with an Example from. **Applied Spectroscopy**, v. 54, n. 3, 2000b.
- OLIVEIRA, M. A. L. DE et al. Analytical Methods and lipids in food by capillary electromigration methods : a review. **Analytical Methods**, v. 8, p. 3649–3680, 2016.
- PRANAITYTE, B.; PADARAUSKAS, A. Characterization of the SDS-induced electroosmotic flow in micellar electrokinetic chromatography with cationic polyelectrolyte-coated capillaries. **Electrophoresis**, v. 27, n. 10, p. 1915–1921, 2006.
- PUSECKER, K.; ALBERT, K.; BAYER, E. Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of high-performance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chromatography A**, v. 836, n. 2, p. 245–252, 1999.
- REINOLD, R. M. Lúpulo - O tempero da cerveja. **Revista de Indústrias e Bebidas**, n. 49, 2009.
- RINNAN, Å.; BERG, F. VAN DEN; ENGELSEN, S. B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 1201–1222, 2009.
- ROJ, E. et al. Supercritical carbon dioxide hops extracts with antimicrobial properties. **Open**

Chemistry, v. 13, n. 1, p. 1157–1171, 2015.

ROSSINI, F. et al. Agronomic performance and beer quality assessment of twenty hop cultivars grown in central Italy. **Italian Journal of Agronomy**, v. 11, n. 3, p. 180–187, 2016.

ROYLE, L. et al. Analysis of hop acids by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 74, n. 2, p. 225–231, 2001.

SANDRA, P.; CLAUS, H.; VERZELE, M. Fatty acids in isomerized hop extracts and gushing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 79, p. 142–147, 1973.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation by simplified least squares procedures. **Anal. Chem.**, v. 36, p. 1627–1632, 1964a.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627–1639, 1964b.

SAVORANI, F.; TOMASI, G.; ENGELSEN, S. B. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 202, n. 2, p. 190–202, 2010.

SCHAEFER, O. et al. Development of a radioimmunoassay for the quantitative determination of 8-prenylnaringenin in biological matrices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 8, p. 2881–2889, 2005.

SCHIMID, K. M.; OHLROGGE, J. B. Lipid Metabolism in Plants. In: **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and membranes**. 4th. ed. [s.l: s.n.]. p. 93–126.

SHELLIE, R. A. et al. Varietal characterization of hop (*Humulus lupulus* L .) by GC – MS analysis of hop cone extracts. **J. Sep. Sci.**, v. 32, p. 3720–3725, 2009.

SHREELALITHA, S. J.; SRIDHAR, K. R. Composition of fatty acids of the lipids extracted from seeds of *sesbania bispinosa* grown on the Indian coastal sand dunes. **Current Nutrition and Food Science**, v. 12, n. 1, 2016.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. [s.l: s.n.].

SIMAS VAZ, F.; MARTA DE OLIVEIRA, C.; LEAL DE OLIVEIRA, M. Fundamentos De Eletroforese Capilar: Uma Abordagem Por Animações. **Quím. Nova**, v. 38, n. 5, p. 732–737, 2015.

SINDICERV. **O setor em números**. Disponível em: <<https://sindicerv.com.br/o-setor-em-numeros>>. Acesso em: 28 out. 2018.

SIRAGUSA, G. R. et al. Antimicrobial activity of lupulone against *Clostridium perfringens* in the chicken intestinal tract jejunum and caecum. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. 853–858, 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Principios de análisis instrumental**. Sexta ed. Santa Fe, Mexico: [s.n.].

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principios de Análisis Instrumental**. Quinta Ed. ed. Madrid: [s.n.].

STEENACKERS, B.; DE COOMAN, L.; DE VOS, D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. **Food Chemistry**, v. 172, p. 742–756, 2015.

STEINHAUS, M.; SCHIEBERLE, P. Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hop cones (*Humulus lupulus* L. variety spalter select) based on GC-olfactometry and odor dilution techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1776–1783, 2000.

STEYER, D.; CLAYEUX, C.; LAUGEL, B. Characterization of the terpenoids composition of beers made with the French hop varieties: Strisselspalt, Aramis, Triskel and Bouclier.

BrewingScience, v. 66, n. 11–12, p. 192–197, 2013.

SZYMAŃSKA, E. et al. Increasing conclusiveness of metabonomic studies by cheminformatic preprocessing of capillary electrophoretic data on urinary nucleoside profiles. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 2, p. 413–420, 2007.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 1–9, 1996.

TERABE, S. et al. Separation of highly hydrophobic compounds by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 516, n. 1, p. 23–31, 1990.

TERABE, S. et al. Cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography: Separation of hydrophobic and enantiomeric compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 636, n. 1, p. 47–55, 1993.

TERABE, S. Capillary Separation: Micellar Electrokinetic Chromatography. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 99–120, 2009.

TOMASI, G.; SAVORANI, F.; ENGELSEN, S. B. icoshift: An effective tool for the alignment of chromatographic data. **Journal of chromatography. A**, v. 1218, n. 43, p. 7832–40, out. 2011.

TYRRELL, E. et al. Structure elucidation and an investigation into the in vitro effects of hop acids on human cancer cells. **Phytochemistry Letters**, v. 3, n. 1, p. 17–23, 2010.

VAN CLEEMPUT, M. et al. Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 6, p. 1220–1230, 2009.

VAN DEN BERG, R. A. et al. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC genomics**, v. 7, p. 142, 2006.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. 3, p. 463–471, 1963.

VAN OPSTAELE, F. et al. Production of novel varietal hop aromas by supercritical fluid extraction of hop pellets—Part 2: Preparation of single variety floral, citrus, and spicy hop oil essences by density programmed supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 147–161, 2012a.

VAN OPSTAELE, F. et al. Characterization of novel varietal floral hop aromas by headspace solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry/olfactometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 50, p. 12270–12281, 2012b.

VANHOENACKER, G. et al. Single-run capillary electrochromatographic analysis of hop acids and prenylated hop flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 24, n. 1, p. 55–58, 2001.

VERZELE, B. M.; DYCK, J. VAN; CLAUS, H. shake 10 g for j h with five I inch glass beads in 100 ml. **J. Inst. Brew**, v. 86, p. 9–14, 1980a.

VERZELE, B. M.; DYCK, J. VAN; CLAUS, H. ON THE ANALYSIS OF HOP BITTER ACIDS. **J. Inst. Brew**, v. 86, p. 9–14, 1980b.

VERZELE, M.; DE KEUKELEIRE, D. **Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids**. Amsterdam: [s.n.].

VILLALBA, R. G. et al. Analysis of Hop Acids and Their Oxidized Derivatives and Iso- r - acids in Beer by Capillary Electrophoresis – Electropray Ionization Mass Spectrometry. **J. Agric. Food Chem**, v. 54, p. 5400–5409, 2006.

VINDEVOGEL, J.; SANDRA, P.; VERHAGEN, L. C. Separation of hop bitter acids by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography with UV-diode array detection. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 13, n. 4, p. 295–298, 1990.

WOLD, S.; SJOSTROM, M. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, n. 58, p. 109–130, 2001.

WU, D. et al. Hybrid variable selection in visible and near-infrared spectral analysis for non-invasive quality determination of grape juice. **Analytica Chimica Acta**, v. 659, p. 229–237, 2010.

ZEKOVIĆ, Z.; PFAF-ŠOVLJANSKI, I.; GRUJIĆ, O. Supercritical fluid extraction of hops. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 1, p. 81–87, 2007.

ZHANG, Z.; CHEN, S.; LIANG, Y. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. **Analyst**, v. 135, p. 1138–1146, 2010.