



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Isabela Cristina de Matos Cunha

**NOVAS ABORDAGENS PARA CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DE
CERVEJAS E SEUS INSUMOS**

**CAMPINAS
2024**

Isabela Cristina de Matos Cunha

**NOVAS ABORDAGENS PARA CARACTERIZAÇÃO ANALÍTICA DE
CERVEJAS E SEUS INSUMOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Augusto

O arquivo digital corresponde à versão final da Tese defendida pela aluna Isabela Cristina de Matos Cunha e orientada pelo Prof. Dr. Fabio Augusto.

**CAMPINAS
2024**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Camila Barleta Fullin - CRB 8462

C914n Cunha, Isabela Cristina de Matos, 1989-
Novas abordagens para caracterização analítica de cervejas e seus insumos / Isabela Cristina de Matos Cunha. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Fabio Augusto.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais. 2. GCxGC-qMS. 3. Análise sensorial descritiva. 4. Microextração em fase sólida. 5. Cerveja. I. Augusto, Fabio, 1964-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: New approaches for the analytical characterization of beers and their ingredients

Palavras-chave em inglês:

Partial least squares discriminant analysis

Comprehensive two-dimensional gas chromatography-quadrupole mass

Descriptive sensory analysis

Solid phase microextraction

Beer

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Fabio Augusto [Orientador]

Leandro Wang Hantao

Guilherme Post Sabin

Marcio Pozzobon Pedroso

Stanislau Bogusz Junior

Data de defesa: 26-03-2024

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3162-2745>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/6812429762077553>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabio Augusto (Orientador)

Prof. Dr. Leandro Wang Hantao (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Guilherme Post Sabin (IQ-UNICAMP)

Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso (UFLA)

Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior (IQSC-USP)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Tese de Doutorado defendida pela aluna **ISABELA CRISTINA DE MATOS CUNHA**, aprovada pela Comissão Julgadora em 26 de março de 2024.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus e Nossa senhora que mantiveram a minha fé viva em todos os momentos.

Aos meus pais Saulo e Celina, sempre foram, são e serão meu alicerce e minha inspiração.

As minhas irmãs Rafaela e Gabriela pelo amor, conselho e sabedoria.

Ao meu noivo Rodrigo, pelo amor, paciência e companheirismo.

“Uma pessoa que nunca cometeu erros, nunca tentou algo novo”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, expresso minha gratidão a Deus e Nossa Senhora, cuja presença fortaleceu minha fé e determinação ao longo de toda esta jornada.

Agradeço profundamente aos meus pais, Saulo e Celina, às minhas irmãs Rafaela e Gabriela, e à minha querida tia Irraquel, pelo amor incondicional e pelo apoio constante que sempre me encorajaram a seguir meu sonho.

Ao meu noivo, Rodrigo, agradeço por estar sempre ao meu lado e por aceitar o desafio de manter nosso relacionamento à distância, possibilitando que eu alcançasse meu tão almejado doutoramento.

Expresso minha gratidão ao Professor Fabio Augusto, que gentilmente aceitou ser meu orientador, compartilhando seus conhecimentos e proporcionando um aprendizado enriquecedor ao longo desses anos.

Agradeço ao Professor Leandro pelas valiosas trocas de conhecimento e pela oportunidade de fazer parte do grupo LCGC. Aos meus colegas da Unicamp e do laboratório, que estiveram sempre ao meu lado, compartilharam risadas e me incentivaram a acreditar na minha capacidade de chegar até aqui. Em especial, expresso minha gratidão a Sofia, Juliana, Victor K., Victor H., Breno, João Raul, Camila, André (frestinha), Carlos (Bezerro), Julian, Amilton, Naiara, Marcella e Roselaine.

Sou imensamente grata a Lucilia, técnica do laboratório, por todo o apoio, orientações e disposição para ajudar, independentemente dos desafios enfrentados.

Agradeço à Professora Helena Bolini pela generosa disponibilização do Laboratório de Ciência Sensorial e Estudo do Consumidor da Faculdade de engenharia de Alimentos da Unicamp, para realização das análises sensoriais. Também expresso minha gratidão à técnica Alessandra, por sua dedicação, ensinamentos e paciência ao me guiar e introduzir-me ao mundo da análise sensorial.

Minha gratidão se estende a toda minha família, que esteve presente em todas as etapas deste percurso. Agradeço aos meus tios Onofre e Maria das Neves, que me acompanharam desde a graduação. Agradeço a Livia, minha irmã do coração, e aos meus sobrinhos João Pedro e Laura, cuja presença renova minhas energias. Agradeço também à minha madrinha Alvani e aos meus afilhados Marina e Mateus, sempre presentes. Às minhas amigas de infância, Erika e Marina, cuja amizade de 30 anos permanece inabalável apesar da distância.

Quero expressar minha profunda gratidão pelas amizades que construí ao longo dos anos em Campinas. Ao Senhor Orlando e à Dona Elza, que foram como pais para mim durante meu tempo na cidade, acolhendo-me e cuidando de mim como se eu fosse um membro da família. À Mayra, uma amiga que compartilhou os anos dessa jornada comigo, sempre me apoiando e ao lado de sua adorável filha Juju, que era uma fonte constante de energia renovadora, uma criança carinhosa e encantadora. À minha querida amiga Rachel, companheira de grandes aventuras, sempre emanando boas vibrações e elevando minha autoestima. E às meninas do Apê 92, Vittoria e Thasci, que me acolheram como parte da família nos momentos finais do doutoramento e me deram todo o suporte necessário.

Por fim, expresso minha profunda gratidão a todos os funcionários do Instituto de Química da Unicamp e à CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado ao longo de 54 meses (Processo 88882.329201/2019-01)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –Brasil (CAPES) –Código de Financiamento 001.

RESUMO

Na presente tese, descreve-se a otimização de um método HS-SPME-GC×GC-MS para analisar impressões digitais voláteis em cervejas Lager, utilizando PCA para insights sobre a relação composição/amostra e correlação entre análise sensorial e perfil de compostos orgânicos voláteis por iPLS-DA. A otimização do procedimento de extração das amostras foi conduzida utilizando planejamento Doehlert. O preparo consistiu inicialmente por um procedimento de descarbonatação por congelamento instantâneo e degelo, desenvolvido para minimizar a perda de compostos voláteis e eliminar efetivamente o CO₂. As condições de modulação criogênica no GC×GC foram otimizadas por meio da análise do somatório total de picos nas regiões com identificação de compostos mais retidos dos cromatogramas. Os resultados da otimização multivariada do procedimento de extração, em que as respostas avaliadas estavam relacionadas ao somatório total de picos, indicaram que a eficiência da extração foi máxima com $V_{am} = 8,00$ mL, $T_{ext} = 40$ °C e $t_{ext} = 30$ min. Sob as condições de extração otimizadas, foi possível identificar aproximadamente 240 a 270 picos cromatográficos na fração volátil das amostras de cerveja. A análise por meio de PCA proporcionou insights valiosos sobre a composição e a qualidade das diferentes amostras. Embora os dois principais componentes selecionados tenham explicado apenas 31,83% da variação total do modelo, essa análise exploratória foi fundamental para verificar a veracidade das informações contidas nos rótulos das cervejas. Para a avaliação das características sensoriais: aroma e sabor do Lúpulo, amargor e sabor do grão, foram obtidas por ADQ, na qual cada painalista atribuiu valores em uma escala hedônica de 0 a 9 para cada parâmetro realizada por meio de painéis sensoriais. Embora os painéis sensoriais sejam insubstituíveis como avaliação primária para o sabor e aroma dos alimentos, ferramentas analíticas, como a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC), podem fornecer uma alternativa valiosa para uma qualificação mais rápida das características sensoriais das amostras. Neste estudo, são apresentados resultados sobre o uso de análises multivariadas que correlacionam propriedades sensoriais de cervejas Lager comerciais, como sabor de lúpulo, amargor e sabor de cevada com o perfil de compostos voláteis obtidos por GC×GC. Essa correlação pode oferecer uma alternativa valiosa, permitindo uma rápida avaliação dos parâmetros sensoriais das amostras. A correlação entre os dados cromatográficos e as características sensoriais foi realizada usando iPLS-DA e permitiu identificar potenciais marcadores que podem diferenciar as intensidades dos atributos sensoriais presentes nas amostras. Os terpenos, como Mirceno, Humuleno, α -Calacorene e Guaiene, foram os mais influentes na diferenciação entre forte e fraco nos atributos de sabor e aroma de lúpulo. Para o amargor, compostos das classes de álcoois superiores, terpenos e ésteres foram relevantes,

enquanto para o sabor do grão, influenciado pela fermentação, destacaram-se regiões com predominância de ésteres. Os resultados revelaram a viabilidade de empregar dados de GC×GC para classificar amostras de cerveja com base em atributos sensoriais específicos, distinguindo-as como "altas" ou "baixas" em determinado atributo sensorial. Uma investigação mais detalhada possibilitou a identificação de compostos voláteis associados a cada atributo sensorial, os quais podem atuar como potenciais marcadores. Para o sabor e aroma do lúpulo, bem como para os contribuintes da intensidade do amargor, foram identificados como potenciais marcadores o Mirceno, o Humuleno e o α -Calacorene Guaiene. Quanto aos potenciais marcadores relacionados ao sabor proveniente dos grãos e da levedura, foram observados o ácido éster 2-feniletílico acético, o acetato de vanilila e o hexadecanoato de etila. Esses achados ressaltam que a combinação de HS-SPME com GC×GC-MS pode representar uma ferramenta robusta para obter informações qualitativas e quantitativas sobre a composição de cervejas, constituindo uma abordagem eficaz na análise sensorial.

Palavras Chaves: iPLS-DA, GC×GC-MS, Análise Sensorial, HS-SPME, Cervejas.

ABSTRACT

In this thesis, the optimization of an HS-SPME-GC×GC-MS method for analyzing volatile fingerprints in Lager beers is described, utilizing PCA for insights into the composition/sample relationship and correlation between sensory analysis and volatile organic compound profile by iPLS-DA. Optimization of the sample extraction procedure was conducted using Doehlert design. The preparation initially involved a procedure of instant freezing and thawing decarbonation, developed to minimize the loss of volatile compounds and effectively eliminate CO₂. Cryogenic modulation conditions in GC×GC were optimized through analysis of the total peak sum in regions with identification of compounds more retained in the chromatograms. Multivariate optimization results of the extraction procedure, where the evaluated responses were related to the total peak sum, indicated that the extraction efficiency was maximum with $V_{\text{am}} = 8.00$ mL, $T_{\text{ext}} = 40$ °C, and $t_{\text{ext}} = 30$ min. Under the optimized extraction conditions, approximately 240 to 270 chromatographic peaks were identified in the volatile fraction of beer samples. PCA analysis provided valuable insights into the composition and quality of different samples. Although the two main selected components explained only 31.83% of the total model variation, this exploratory analysis was crucial to verify the accuracy of the information contained on beer labels. For sensory characteristics evaluation: hop aroma and flavor, bitterness, and grain flavor were obtained through ADQ, in which each panelist assigned values on a hedonic scale from 0 to 9 for each parameter via sensory panels. Although sensory panels are irreplaceable as primary evaluation for food taste and aroma, analytical tools such as comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC) can provide a valuable alternative for a quicker qualification of sample sensory characteristics. This study presents results on the use of multivariate analyses correlating sensory properties of commercial lager beers, such as hop flavor, bitterness, and barley flavor, with the profile of volatile compounds obtained by GC×GC. This correlation can offer a valuable alternative, allowing for a rapid assessment of sample sensory parameters. The correlation between chromatographic data and sensory characteristics was performed using iPLS-DA and allowed the identification of potential markers that can differentiate the intensities of sensory attributes present in the samples. Terpenes such as Mircene, Humulene, α -Calacorene, and Guaiene were the most influential in differentiating between strong and weak attributes of hop flavor and aroma. For bitterness, compounds from the classes of higher alcohols, terpenes, and esters were relevant, while for grain flavor, influenced by fermentation, regions with a predominance of esters were highlighted. The results revealed the feasibility of employing GC×GC data to classify beer samples based on specific sensory attributes, distinguishing them as "high" or "low" in certain

sensory attributes. A more detailed investigation enabled the identification of volatile compounds associated with each sensory attribute, which can act as potential markers. For hop flavor and aroma, as well as contributors to bitterness intensity, Mircene, Humulene, and α -Calacorene Guaiene were identified as potential markers. Regarding potential markers related to grain and yeast-derived flavor, 2-phenylethyl acetic acid, vanillin acetate, and ethyl hexadecanoate were observed. These findings emphasize that the combination of HS-SPME with GC \times GC-MS can be a robust tool to obtain qualitative and quantitative information about the composition of beers, representing an effective approach in sensory analysis.

Keywords: iPLS-DA, GC \times GC-MS, Sensory Analysis, HS-SPME, Beers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustra o formato desses dois tipos de cevada, os quais, dependendo da disposição dos grãos na espiga, podem ser classificados como dísticos (com duas fileiras de grãos) (A) ou hexásticos (com seis fileiras) (B).	25
Figura 2: Cones de Lúpulo. (A) Flor (inflorescência de uma planta fêmea); (B) corte longitudinal do cone no qual podem ser observadas as glândulas lupulinas.	28
Figura 3: Etapas do processo de produção de cerveja. Variações e técnicas específicas podem ser aplicadas de acordo com o estilo desejado e as preferências do fabricante. Adaptado de ³⁰ .	34
Figura 4: Esquema do suporte para SPME (<i>holder</i>) e fibra. Este foi o primeiro dispositivo comercial de SPME desenvolvido pela Supelco. Adaptado da referência ⁷³ .	45
Figura 5: Mecanismos de extração para revestimentos de fibra absorventes (líquidos) e adsorventes (sólidos). Adaptado da referência ⁷⁵ .	46
Figura 6: Configuração da extração por Microextração em Fase Sólida de Headspace. Adaptado da referência ⁷⁵ .	49
Figura 7: Instrumentação de GC×GC (A) e princípio de modulação (B, C e D). Adaptado da referência ^{119,120} .	53
Figura 8: Visualização 3D obtida, com o terceiro eixo (z) representando a intensidade do pico de um cromatograma obtido por separações GC×GC-MS. (Próprio autor)	54
Figura 9: Diagramas de moduladores criogênicos. (A) LMCS, (B) modulador criogênico de duplo jato, (C) modulador com dois jatos quentes e dois jatos frios, (D) modulador com um jato quente e um jato frio. "Inj." refere-se ao Injetor, "Det." ao Detector, e "aquec." ao aquecimento. Adaptado da referência ¹²⁰ .	55
Figura 10: Cromatogramas GC×GC-MS obtidos durante a otimização do período de modulação para (A) 4s (3 s de jato frio e 1 s de jato quente) e (B) 6s (4,5 s de jato frio e 1,5 s de jato quente).	77
Figura 11: Cromatogramas bidimensionais obtidos a partir de duas fibras diferentes (DVB/CAR/PDMS, divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano; PDMS/DVB, polidimetilsiloxano/divinilbenzeno) utilizando a mesma amostra e nas mesmas condições: $V_{am} = 8$ mL, $T_{ext} = 50$ °C, $t_{extração} = 30$ min, agitação a 1200 rpm e 2 mL de solução salina saturada.	78
Figura 12: Diagrama da superfície de resposta mostrando os efeitos das variáveis significativas do HS-SPME-GC×GC-MS.	79
Figura 13: Gráfico residual versus os valores previstos para a validação do modelo de Metodologia de Superfície de Resposta.	80

Figura 14: Cromatograma bidimensional da análise de uma amostra de cerveja obtida por HS-SPME-GC×GC-MS: (A) método não otimizado (T= 32°C e t = 22 min); (B) método otimizado (T= 40°C e t = 30 min).....	80
Figura 15: Cromatogramas bidimensionais de impressões digitais de amostras de cerveja agrupadas pelo estilo informado pelo fabricante, obtidos por meio do método otimizado HS-SPME-GC×GC-MS. # = códigos das amostras. # = códigos das amostras.	82
Figura 16: Gráfico de pontuações do PCA do <i>fingerprints</i> 22 amostras de cervejas Lager obtidos por HS-SPME-GC×GC. Os números referem-se as triplicatas das amostras e as formas geométricas os estilos: ▲ =Premium american Lager; ◆ = Pilsen; ★ = American Lager; ▼ = Lager; ■ = Standart American Lager.	90
Figura 17: Características sensoriais atribuíveis aos estilos e suas famílias, com destaque para as características sensoriais avaliadas no presente estudo.	101
Figura 18: Esquema do processo de Análise Descritiva Quantitativa das amostras.	101
Figura 19: Análise das propriedades aromáticas das vinte e duas amostras.	102
Figura 20: Cromatogramas obtidos através da técnica HS-SPME-GC×GC-MS para as amostras 4, 16 e 17, respectivamente classificadas como "forte", "média" e "fraca" para o amargor com base na relação estabelecida por iPLS-DA, em concordância com ADQ para todos os atributos investigados.....	104
Figura 21: Esquema representativo dos dados de entrada para obtenção do modelo de classificação por iPLS-DA.....	105
Figura 22: Cromatogramas bidimensionais exibem as regiões cruciais para a discriminação dos modelos, destacadas em vermelho. Essas áreas delimitadas representam os intervalos selecionados pelo modelo iPLS-DA para as maiores e menores pontuações de cada atributo sensorial avaliado.....	107
Figura 23: Resultado obtido pelo modelo iPLS-DA para a variável Y predita como "forte" do sabor do grão, a partir das 22 amostras analisadas em triplicata. A linha vermelha tracejada representa o limite entre as duas classes ("forte" e "fraco"), com um valor igual a 0,56. Os diamantes vermelhos indicam as amostras classificadas sensorialmente como "forte" e os quadrados verdes as amostras classificadas como "fraco".....	110
Figura 24: Resultado obtido pelo modelo iPLS-DA para a variável Y predita como "forte" do sabor do lúpulo, a partir das 22 amostras analisadas em triplicata. A linha vermelha tracejada representa o limite entre as duas classes ("forte" e "fraco"), com um valor igual a 0,48. Os diamantes vermelhos indicam as amostras classificadas sensorialmente como "forte" e os quadrados verdes as amostras classificadas como "fraco".....	111

Figura 25: Resultado obtido pelo modelo iPLS-DA para a variável Y predita como "forte" do aroma do lúpulo, a partir das 22 amostras analisadas em triplicata. A linha vermelha tracejada representa o limite entre as duas classes ("forte" e "fraco"), com um valor igual a 0,53. Os diamantes vermelhos indicam as amostras classificadas sensorialmente como "forte" e os quadrados verdes as amostras classificadas como "fraco" 112

Figura 26: Resultado obtido pelo modelo iPLS-DA para a variável Y predita como "forte" do sabor amargo, a partir das 22 amostras analisadas em triplicata. A linha vermelha tracejada representa o limite entre as duas classes ("forte" e "fraco"), com um valor igual a 0,55. Os diamantes vermelhos indicam as amostras classificadas sensorialmente como "forte" e os quadrados verdes as amostras classificadas como "fraco" 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 :Identificação e qualificação das amostras de cerveja analisadas.	72
Tabela 2 : Planejamento de Doehlert para a Otimização de HS-SPME.	75
Tabela 3 : Condições otimizadas para a modulação criogênica.	76
Tabela 4 : Níveis para variáveis otimizadas em cada experimento de otimização e respostas correspondentes (total de picos cromatográficos detectados).....	79
Tabela 5 : Compostos identificados nas amostras pelo método otimizado HS-SPME-GC×GC-MS.	83
Tabela 6 : Atributos sensoriais determinados para as amostras de cerveja.	101
Tabela 7 :Tamanho do Intervalo de variáveis Latentes para cada atributo e as suas respectivas variáveis latentes usadas para modelagem por iPLS-DA.	105
Tabela 8 : Tabela com as figuras de méritos do modelo de classificação por iPLS-DA obtida para os atributos sensoriais avaliados para os conjuntos de Calibração (CAL) e Validação (VAL). SG= Sabor do Grão, SL= Sabor do Lúpulo, AL= Aroma do Lúpulo e AMG= amargor.	108
Tabela 9 : Resultados do modelo PLS-DA aplicados a amostras de cervejas descritas como forte e fraco para cada característica sensorial.	115

LISTA DE ABREVIATURAS

¹ D:	primeira dimensão
GC:	cromatografia gasosa monodimensional
¹ t _R :	tempo de retenção na primeira dimensão
² D:	segunda dimensão
² t _R :	tempo de retenção na segunda dimensão
GC×GC:	cromatografia gasosa bidimensional abrangente
MS:	espectrometria de massas
QMS:	espectrometria de massas por quadrupolo
ADQ:	análise sensorial descritiva quantitativa
iPLS-DA:	análise discriminante de mínimos quadrados parciais de intervalo
LLE:	extração líquido-líquido
SPE:	extração em fase sólida
SPME:	microextração em fase sólida
VOC:	compostos orgânicos voláteis
HS-SPME:	microextração em fase sólida por <i>headspace</i>
DI:	imersão direta
HS:	headspace
DVB:	divinilbenzeno
PDMS:	polidimetilsiloxano
PA:	poliacrilato
PEG:	polietilenoglicol
CAR:	carboxeno
GC×GC-QMS:	cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada a espectrometria de massas em quadrupolo
GC-QMS:	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em quadrupolo
MDGC:	cromatografia gasosa multidimensional
GC - GC:	cromatografia gasosa bidimensional de frações parciais
LMCS:	sistema criogênico longitudinalmente modulado
N _{2(l)} :	nitrogênio líquido
TOFMS:	espectrometria de massas por tempo de voo
PCA:	análise de componentes principais
PLS-DA:	análise discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais

COW:	correlation optimized warping
icoshift:	interval correlation optimized shifting.
LV:	variável latente
DBWAX:	fase estacionária que contém polietilenoglicol
Rxi-SSIL-5ms:	fase estacionária que contém (5 %-fenil) -metilpolisiloxano
BJCP:	programa de certificação de juízes de cerveja
NIST:	instituto nacional de padrões e tecnologia
LTPRI:	índice de retenção com programação linear de temperatura
CAS:	Chemical Abstracts Service
RMSECV:	erro quadrático médio de validação cruzada
TP:	verdadeiro positivo
TN:	verdadeiro negativo
FP:	falso positivo
FN:	falso negativo
SENS:	sensibilidade de classes
SPEC:	especificidade de classes
EFF:	eficiência
VAL:	validação
CAL:	calibração
SG:	sabor do grão
SL:	sabor do lúpulo
AL:	aroma do lúpulo
AMG:	amargor
RSM:	metodologia de superfície de resposta

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	7
CAPÍTULO 1	22
INTRODUÇÃO GERAL, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, OBJETIVO GERAL.....	22
1. INTRODUÇÃO GERAL	23
1.1 História da cerveja	23
2. INGREDIENTES	24
2.1 Cevada e malte	24
2.2 Água	27
2.3 Lúpulo	28
2.4 Levedura	29
2.5 Adjuntos.....	31
2.6 Aditivos	32
3. PRODUÇÃO DA CERVEJA.....	33
4. AS DIRETRIZES DE ESTILOS BJCP (BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM).....	36
4.1 Standard American Beer:	37
4.2. International Lager.....	38
5. ANÁLISE SENSORIAL.....	39
5.1 Análise Descritiva Quantitativa.....	40
6. COMPOSTOS AROMÁTICOS	41
7. PREPARO DE AMOSTRAS	42
7.1 Microextração em Fase Sólida (SPME)	43
8. GC-MS	50
9. GC×GC	51
9.1 Moduladores.....	54
9.2 Detector	56

10. HS-SPME-GC×GC-QMS para análises de alimentos.....	57
10.1 Otimização HS-SPME-GC×GC-QMS	59
10.2 Estrutura dos dados	61
11. ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS	62
11.1 Pré- processamento	62
11.2 Métodos de análise exploratória dos dados	65
11.3 Métodos Supervisionados de reconhecimento de padrões	65
OBJETIVO GERAL.....	68
CAPÍTULO 2 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DE UM PROCEDIMENTO HS- SPME+GC×GC-MS PARA DETERMINAR IMPRESSÕES DIGITAIS DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE CERVEJAS LAGER	69
RESUMO	70
1. INTRODUÇÃO.....	71
2. MATERIAIS E MÉTODOS	72
2.1 Materiais	72
2.2 Preparo das amostras de cerveja.....	73
2.3 Otimização das Condições Operacionais do GC×GC-MS	74
2.4 Procedimentos de Otimização para HS-SPME.....	74
2.5 Processamento e análise de dados	75
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
3.1 Otimização do sistema GC×GC-MS Modulação	75
3.2 HS-SPME.....	77
4. CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE CERVEJAS LAGER.	81
5. CONCLUSÕES	92
CAPÍTULO 3 DADOS DE CROMATOGRAFIA GASOSA COMO UMA FERRAMENTA AUXILIAR PARA PREDIZER CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DE CERVEJAS ...	95
1. INTRODUÇÃO.....	96
2. MATERIAL E MÉTODOS	97
2.1 Reagentes E Materiais	97
2.2 GC×GC	98
2.3 Análise sensorial.....	98
2.4 HS-SPME.....	99

2.4 Processamento dos dados cromatográficos.....	99
3.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	100
3.1. Análise Sensorial.....	100
3.2 HS-SPME- GC×GC-MS.....	103
3.4 Potenciais Marcadores.....	113
4.0 CONCLUSÃO.....	118
CAPÍTULO 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS e APÊNDICE.....	120
REFERÊNCIAS.....	120
APÊNDICE.....	135

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL, REVISÃO BIBLIOGRÁFICA, OBJETIVO GERAL

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 História da cerveja

A história da cerveja remonta a milhares de anos, com origens profundas em diversas culturas antigas. Evidências arqueológicas indicam que a produção de cerveja teve início na Mesopotâmia por volta de 5.000 a.C., sendo documentada em uma tábua suméria, um dos primeiros registros escritos sobre a bebida. Ao longo dos séculos, a cerveja desempenhou papéis significativos em sociedades como as egípcias, gregas e romanas, frequentemente associada a rituais religiosos e celebrações¹.

Durante a Idade Média, monges europeus refinaram as técnicas de produção de cerveja em mosteiros, contribuindo para a disseminação e aprimoramento da bebida. Em meio a condições sanitárias precárias, a cerveja tornou-se uma parte essencial da dieta diária em muitas comunidades, proporcionando uma alternativa segura à água contaminada¹.

A Revolução Industrial trouxe avanços significativos na produção de cerveja, com a invenção de máquinas a vapor e a aplicação de técnicas de fermentação controlada. No século XX, a ascensão das cervejarias artesanais e a diversificação de estilos redefiniram o cenário cervejeiro global¹.

A cerveja é uma bebida alcoólica derivada da fermentação direta de açúcares liberados pelo amido dos grãos. Classificada como a terceira bebida mais popular do mundo, após a água e o chá, a cerveja utiliza grãos como principal fonte de açúcar, sendo comumente reconhecida quando esse açúcar é convertido do amido por meio de reações enzimáticas em uma mistura de grãos e água semelhante a um mingau, denominada "mostura". Na produção tradicional, parte dos grãos na mostura deve ser maltada, processo que envolve germinação e secagem, resultando no desenvolvimento de enzimas e acessibilidade do amido para a conversão^{1,2}.

O líquido açucarado extraído da mosturação, chamado mosto, é então aquecido até levantar fervura, momento em que o lúpulo é adicionado. O lúpulo é o condimento mais comumente utilizado na produção moderna de cerveja, contribuindo com compostos de amargor e sabor desejados. Com uma fervura geralmente mínima de uma hora, o processo torna o mosto estéril, proporcionando uma base limpa para a ação da levedura cervejeira. Outras especiarias e flavorizantes podem ser adicionados durante a fervura²⁻⁴.

Ao final da fervura, o mosto é resfriado e a levedura é acrescentada, a menos que se pretenda submeter o mosto à fermentação espontânea. Em poucos dias, a maioria dos açúcares é consumida, resultando na produção de álcool e compostos de sabor, transformando o mosto em cerveja. Posteriormente, períodos e temperaturas de condicionamento e/ou transformações adicionais podem ser aplicados, mas o líquido já adquire a denominação de "cerveja"^{1,4,5}.

A cerveja pode ser classificada com base nos tipos de leveduras, sendo cervejas de alta fermentação, como ale, e de baixa fermentação, como lager e pilsner. A diversidade de ingredientes utilizados resulta em variações de sabor, e as características sensoriais também influenciam a categorização, com cervejas amargas (alta presença de lúpulo, proporcionando um gosto amargo), cervejas doces (elevado teor de açúcar, conferindo um gosto adocicado) e cervejas azedas (com teor elevado de ácidos orgânicos, como ácido láctico e ácido cítrico)³.

O processo de fermentação da cerveja é conduzido pela levedura, que utiliza os nutrientes do mosto para realizar reações metabólicas. Durante a produção e armazenamento, a reação de Maillard ocorre, gerando compostos heterocíclicos, como furanonas e pirazinas, que contribuem para os sabores distintos da cerveja⁴.

A composição aromática da cerveja é vasta e inclui álcoois, cetonas, ésteres, aldeídos, fenóis, ácidos, enais, lactonas, furanos, alcanos, glioxal e compostos aromáticos. Alguns desses compostos, como acetato de 3-metilbutila, acetato de etila, 12-metiltridecanal, 2-metil-3-furantiol, 2-furfuriltiol, metanotiol e nonanal, exercem influência significativa no sabor da cerveja, com valores de OAV (*Over All Value*) superiores a 1000. Outros compostos, como 4-hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona, damascenona, metilpropanoato de etila, 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona, aldeído caprílico, 3,7-dimetilocta-1,6-dien-3-ol, aldeído acético, butanoato de etila, 1-octen-3-ona, 3-(metilsulfanil)propanal, metilpropanal, 2-metilpropanoato de etila, 2,4-decadienal, 2-nonenal, (S)-etil 2-metilbutanoato, tetrahydro-4-metil-2-(2-metilpropenil)-2H-pirano e 2-feniletanol, possuem OAVs variando de 100 a 1000, contribuindo significativamente para a riqueza de sabores^{2,3}.

2. INGREDIENTES

2.1 Cevada e malte

A cevada (*Hordeum vulgare*) desempenha um papel vital na produção de cerveja, sendo um dos principais grãos empregados nesse processo. Sua seleção criteriosa se deve às suas

características singulares, as quais conferem propriedades desejadas ao malte, um dos componentes essenciais na elaboração de cerveja¹.

As técnicas modernas de melhoramento genético têm gerado variedades de cevada excelentes, proporcionando benefícios aos agricultores globalmente. Os grãos de cevada são a preferida para o processo de maltagem, embora outros cereais possam ser utilizados. A classificação da cevada cultivada engloba distinções baseadas na disposição dos grãos na espiga. Comumente, são categorizadas entre cevadas de duas (dísticas) e seis (hexásticas) fileiras. A Figura 1 ilustra o formato desses dois tipos de cevada. Os grãos de cevada dística geralmente são maiores, mais uniformes e possuem uma casca mais fina, o que resulta em um conteúdo útil maior para a produção de malte e menores quantidades de compostos fenólicos e substâncias amargas. Este tipo de cevada, de tamanho de grão mais homogêneo, é tradicionalmente preferido pela indústria de malte e cerveja^{5,6}.

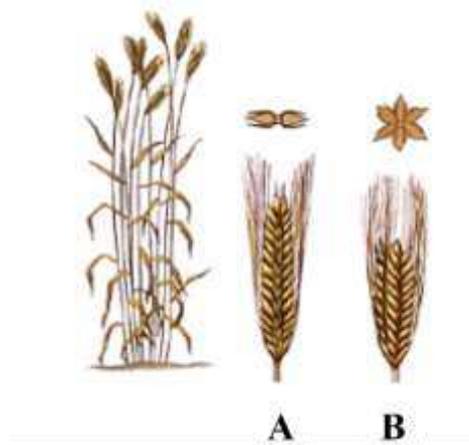


Figura 1: Ilustra o formato desses dois tipos de cevada, os quais, dependendo da disposição dos grãos na espiga, podem ser classificados como dísticos (com duas fileiras de grãos) (A) ou hexásticos (com seis fileiras) (B).

O malte, resultante da germinação e secagem de grãos de cevada, é crucial na produção de cerveja, sendo a qualidade determinada pela uniformidade do tamanho do grão, friabilidade e poder diastático. Este último reflete a capacidade do malte de converter o amido em açúcar fermentável, posteriormente transformado em etanol durante a fermentação. Cevadas destinadas à maltagem geralmente possuem teor de proteína reduzido, prevenindo turvações indesejadas na cerveja^{7,8}.

Durante o processo de maltagem, o início se dá com a imersão dos grãos em água. Nesta etapa, os grãos de cevada são mergulhados em água para dar início ao processo de germinação,

ativando enzimas responsáveis pela conversão do amido em açúcares fermentáveis. Após a germinação, o processo é interrompido pela secagem, preservando as enzimas e açúcares recém-formados. O resultado é o malte, grão rico em nutrientes e açúcares essenciais para a etapa subsequente na produção de cerveja^{6,7}.

A maltagem é um processo tecnológico que busca modificar a cevada cervejeira para obter os maltes tradicionais utilizados na produção de cerveja. Durante a maceração, germinação e secagem, enzimas amilolíticas, proteolíticas e citolíticas são ativadas pela decomposição de proteínas e amido, afrouxando a estrutura do endosperma e conferindo ao malte características sensoriais apropriadas. Apesar da crescente popularidade de cervejas com adição de outros ingredientes ou baseadas em elementos além do malte de cevada, as cervejas são produzidas globalmente a partir de maltes obtidos de diversos cereais⁹.

O malte desempenha papéis cruciais na produção de cerveja. Os açúcares presentes no malte são fundamentais para o processo de fermentação, no qual a levedura converte esses açúcares em álcool e dióxido de carbono. Além disso, o malte contribui significativamente para o perfil de sabor da cerveja, fornecendo complexidade e nuances devido aos compostos aromáticos e sabores desenvolvidos durante a maltagem. A escolha da cevada e o método de maltagem empregado podem impactar diretamente a qualidade e o caráter da cerveja final. Diferentes tipos de malte, como malte de cevada torrado, malte de trigo, entre outros, proporcionam uma ampla variedade de sabores, cores e aromas, permitindo a criação de cervejas com características únicas^{8,9}.

Os cereais não maltados podem exercer uma influência significativa no aroma das cervejas de várias maneiras. Primeiramente, eles adicionam uma gama de compostos aromáticos próprios, que podem variar dependendo do tipo de cereal utilizado, incluindo notas de grãos, cereais, ou características frutadas ou florais, dependendo da composição específica. Além disso, esses cereais podem afetar a produção de açúcares fermentáveis durante a mosturação, já que não passaram pelo processo de malteação, resultando em uma contribuição de açúcares que pode ser diferente dos maltes tradicionais. Isso pode levar a uma fermentação diferenciada, gerando aromas únicos da interação entre os açúcares e as leveduras. Adicionalmente, os cereais não maltados também podem influenciar a textura e a sensação na boca da cerveja, afetando a percepção do aroma, proporcionando sensações como cremosidade, suavidade, corpo ou adstringência, que interagem com os aromas presentes na cerveja^{1,10,11}.

2.2 Água

A água desempenha um papel crucial na produção de cerveja, sendo um dos principais ingredientes que influenciam diretamente a qualidade e o perfil de sabor da bebida final. Sua composição e características exercem impacto em diversos aspectos do processo cervejeiro, desde a maceração dos grãos até a etapa de fermentação. O tipo de água desempenha um papel essencial na definição de características específicas da cerveja, como, por exemplo, o seu sabor. O uso adequado da água pode auxiliar o cervejeiro na conferência de diversas características distintas à sua cerveja.¹²⁻¹⁴.

Cervejeiros costumam ajustar a composição da água para se adequar aos estilos específicos de cerveja que estão produzindo. Por exemplo, cervejas do estilo Pilsner podem se beneficiar de água mais suave, enquanto cervejas mais escuras podem requerer água com maior teor mineral¹². A presença de minerais como cálcio, magnésio e sulfatos desempenha um papel crucial na formação do perfil de sabor, conferindo complexidade e realçando características específicas das cervejas. Durante a produção de cerveja, o pH da água assume um papel crítico, sendo vital manter um pH adequado em várias etapas do processo, como durante a maceração, para garantir a eficiência das enzimas envolvidas na conversão de amido em açúcares fermentáveis.

A água utilizada tem um impacto direto na percepção do amargor na cerveja, especialmente em estilos mais lupulados. Íons como sulfato e cloreto exercem efeitos distintos sobre o equilíbrio entre o amargor do lúpulo e a doçura do malte^{13,15}. Em termos gerais, a água ideal para a fabricação de cerveja é caracterizada por um pH entre 6,5 e 7,0; menos de 100 mg L⁻¹ de carbonato de cálcio ou magnésio; traços de magnésio, preferencialmente na forma de sulfatos; de 250 a 500 mg L⁻¹ de sulfato de cálcio; de 200 a 300 mg L⁻¹ de cloreto de sódio; e menos de 1 mg L⁻¹ de ferro¹⁶. Muitas cervejarias exploram as características únicas da água de sua região para criar cervejas distintas, um aspecto evidente em cervejas tradicionais associadas a determinadas áreas geográficas.

Algumas cervejarias optam por implementar sistemas de tratamento da água como parte de suas práticas para assegurar consistência em suas produções cervejeiras. Esses sistemas podem abranger desde a remoção de impurezas indesejadas até a adição controlada de minerais, tudo com o intuito de atender às especificações desejadas. Em sintonia com a crescente conscientização ambiental, cervejeiros estão cada vez mais adotando práticas sustentáveis no manejo da água, buscando métodos que conservem esse recurso vital. Em suma, a água transcende sua função como mero solvente na produção de cerveja; é um elemento dinâmico que

contribui para a singularidade e caráter de cada cerveja. A compreensão e o controle meticuloso da qualidade da água são imperativos para os cervejeiros que almejam consistência e excelência em suas criações¹⁵.

2.3 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) desempenha um papel indispensável na produção de cerveja, conferindo estrutura ao amargor, aprimorando sua estabilidade microbiológica, contribuindo para a estabilização da espuma e exercendo significativa influência sobre o sabor e aroma da bebida^{1,17}. Originária da Europa, esta trepadeira produz flores (Figura 2A), conhecidas como cones, que são colhidas e empregadas no processo cervejeiro. Essas flores possuem maiores quantidades de glândulas que são responsáveis pela secreção de um pó amarelo chamado de lupulina (Figura 2B). Nesse pó estão presentes diversas substâncias químicas, como resinas (com α - e β -ácidos), óleos essenciais e polifenóis, que dão a cerveja amargor, aroma e propriedades antioxidantes, respectivamente. Além de outras substâncias associadas a questões como a estabilidade da espuma ou até a proteção contra contaminações microbiológicas da cerveja. O gênero *Humulus* é reconhecido por cinco variedades taxonômicas, destacando-se os lupulus, lúpulos europeus; os cordifolius, lúpulos japoneses; e os lupuloides, neomexicanus e pubescens, nativos norte-americanos¹⁸.



Figura 2: Cones de Lúpulo. (A) Flor (inflorescência de uma planta fêmea); (B) corte longitudinal do cone no qual podem ser observadas as glândulas lupulinas.

No mercado, o lúpulo é categorizado em duas classes principais: lúpulos de amargor e lúpulos de aroma. Algumas variedades também são comercializadas como de duplo propósito. Os lúpulos de amargor, também conhecidos como lúpulos de fervura, são adicionados ao mosto próximo ao início da fervura. Esses lúpulos contêm α -ácidos, responsáveis por conferir amargor à cerveja. Sua adição durante a fervura equilibra o dulçor proveniente do malte, resultando em diferentes níveis de amargor, conforme o estilo desejado, sendo, portanto, incorporados no início

do processo de fervura. Já os lúpulos aromáticos, além de contribuírem para o amargor, desempenham um papel significativo no perfil aromático e de sabor da cerveja^{1,19}.

Com uma ampla variedade de espécies disponíveis, os cervejeiros têm a opção de escolher lúpulos que ofereçam notas cítricas, florais, frutadas ou herbáceas, agregando complexidade e singularidade à cerveja. Esses lúpulos de aroma são geralmente adicionados no final da fervura ou durante a fermentação, sendo selecionados principalmente por suas características aromáticas distintas^{17,20}.

O lúpulo pode ser incorporado à produção de cerveja de diversas maneiras, sendo comumente disponível em formatos como pellets, flores e óleo essencial. A utilização de flores in natura requer operações de secagem devido ao volume considerável, o que apresenta desafios no transporte e armazenamento. Uma alternativa eficaz é a prensagem das folhas, reduzindo significativamente o volume pela metade. Embora as flores preservem mais óleo essencial, elas são mais dispendiosas e menos eficientes em termos de amargor quando comparadas aos pellets. Os pellets, obtidos por meio de moagem e compressão, proporcionam consistência e eficiência, porém a ruptura das glândulas de lupulina acelera a oxidação. Extratos de lúpulo, apresentados na forma de óleo essencial, oferecem a vantagem de redução de massa e volume, facilitando o transporte e armazenamento.

A adição desses extratos proporciona benefícios como fácil manuseio, menor necessidade de espaço de armazenamento e maior vida útil sem degradação oxidativa. Esses extratos são fundamentais para obter sabores específicos de lúpulo e podem ser introduzidos tanto no início da fervura quanto durante a fermentação/maturação. Entretanto, a obtenção desses extratos envolve processos de extração com solventes orgânicos, exigindo cuidados na purificação para garantir alta qualidade^{1,15}.

2.4 Levedura

As leveduras desempenham um papel crucial no processo de fermentação da cerveja, convertendo açúcares em álcool e dióxido de carbono, resultando na transformação do mosto doce em uma bebida alcoólica e carbonatada¹. Pertencendo ao grupo dos fungos unicelulares, as leveduras abrangem diversos gêneros, sendo o *Saccharomyces* um dos mais proeminentes. As leveduras *Saccharomyces*, são compostas principalmente de carboidratos, proteínas, lipídios, minerais e DNA/RNA, com proporções variáveis desses componentes conforme as condições de crescimento²¹.

A *Saccharomyces cerevisiae* é amplamente empregada na produção de cervejas ale, também conhecida como levedura de alta fermentação, devido à sua associação histórica com a produção de cerveja, refletida até mesmo em seu nome *cerevisiae*, que significa "de cerveja". Em contraste, a levedura lager, domesticada mais recentemente, é uma espécie distinta denominada *Saccharomyces pastorianus*. Esta levedura foi identificada como um híbrido natural entre *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus*, esta última ocasionalmente usada na produção de vinho²¹. Devido ao seu uso mais recente, as leveduras lager não apresentam tanta diversidade genética quanto as leveduras ale, resultando em perfis de sabor mais homogêneos entre as cervejas lager produzidas em diferentes cervejarias ao redor do mundo^{21,22}.

As leveduras ale e lager podem crescer de forma aeróbia e anaeróbia. Na presença de oxigênio, as células são estimuladas a se dividir e produzir biomassa em vez de etanol. O processo de fermentação tem início quando o mosto resfriado é transferido para o fermentador, e as leveduras são adicionadas. Esses micro-organismos unicelulares iniciam o processo de reprodução e consomem os açúcares disponíveis²³⁻²⁵. Durante as primeiras horas de fermentação, quando as células de levedura estão sob condições aeróbicas, elas se dividem e simultaneamente produzem etanol. Durante essa fase, a levedura também gera calor, um fator crucial que precisa ser considerado no controle preciso da temperatura durante a fermentação. Uma vez que o oxigênio se esgota, a levedura entra num ambiente anaeróbico e mantém a produção de etanol a uma taxa mais lenta. Enquanto as cervejas de estilo ale fermentam em temperaturas mais elevadas, geralmente entre 15°C e 24°C, as cervejas de estilo lager passam por fermentação em temperaturas mais baixas, tipicamente entre 7°C e 13°C. Este controle cuidadoso da temperatura é essencial para moldar as características finais da cerveja^{1,23,26}.

Além de desempenharem um papel fundamental na produção de álcool, as leveduras exercem uma contribuição significativa para o perfil de sabor e aroma da cerveja. Durante o processo de fermentação, esses micro-organismos unicelulares produzem uma variedade de compostos voláteis, incluindo ésteres e fenóis, álcoois superiores, compostos de enxofre e dicetonas que conferem à cerveja características frutadas, condimentadas e outras nuances distintas. A seleção criteriosa da cepa de levedura, a quantidade utilizada e as condições de fermentação são fatores cruciais controlados pelos cervejeiros para atingir o perfil desejado na cerveja final^{23,25,26}.

Em resumo, as leveduras desempenham um papel multifacetado na fermentação de cervejas, indo além da simples conversão de açúcares em álcool. Esses microorganismos são

determinantes para o perfil sensorial da cerveja, proporcionando uma ampla variedade de estilos e aromas que tornam a cerveja uma bebida verdadeiramente diversificada e cativante.

2.5 Adjuntos

Os adjuntos exercem uma função crucial na produção de cerveja, influenciando tanto o sabor quanto as características finais da bebida. São ingredientes adicionados à cerveja, complementando os elementos fundamentais como água, malte, lúpulo e leveduras. Esses ingredientes abrangem uma diversidade de grãos, açúcares, frutas, especiarias e outros elementos que enriquecem a receita cervejeira^{1,27,28}.

Os adjuntos podem ser incorporados de duas maneiras: na forma líquida ou sólida. Adjuntos líquidos são frequentemente denominados "aumentadores de mosto", pois possibilitam o aumento no rendimento da cervejaria sem a necessidade adicional de moagem, mosturação e filtração do mosto. Já os adjuntos sólidos devem ser adicionados durante a mosturação, uma vez que requerem enzimas presentes no malte ou enzimas adicionadas externamente para a digestão de suas macromoléculas. Esses adjuntos sólidos incluem uma variedade de cereais não maltados, com destaque para cevada, trigo, milho, arroz, aveia, centeio e sorgo^{1,27}.

É importante destacar que a substituição completa do malte de cevada na fabricação de cerveja não é permitida de acordo com diferentes normativas internacionais, uma vez que é estabelecido um teor mínimo de malte de cevada para definir o produto como "cerveja". Os cervejeiros utilizam adjuntos em diversas formas para incorporar sabores e aromas à cerveja, sendo essenciais para proporcionar complexidade e diversidade aos variados estilos encontrados no mercado. A inclusão de adjuntos proporciona aos cervejeiros uma oportunidade valiosa para explorar uma ampla variedade de sabores e estilos, possibilitando a criação de cervejas únicas e inovadoras^{25,27-29}.

Grãos como trigo, aveia e centeio são frequentemente utilizados como adjuntos para conferir texturas específicas, como a suavidade característica da aveia em cervejas do estilo *Oatmeal Stout*. A adição de açúcares extras, como mel, xaropes ou frutas, contribui para a complexidade do sabor e pode elevar o teor alcoólico da cerveja. Em estilos como as *Belgian Strong Ales*, a prática tradicional de adicionar açúcar cristal ("candi") resulta em cervejas robustas e ricas em álcool. Além disso, os adjuntos desempenham um papel cultural em algumas cervejas tradicionais, como no caso das cervejas belgas do estilo *Witbier*, em que a adição de casca de laranja e sementes de coentro é comum, proporcionando características cítricas e condimentadas distintas²⁸.

Os grãos de trigo, arroz e milho desempenham um papel fundamental na indústria cervejeira, sendo utilizados em diversas formas. O trigo é amplamente empregado, seja como adjuvante para realçar o sabor em proporções menores, como 10-15 % da matéria-prima, ou como malte de trigo, representando mais de 55 % da matéria-prima em cervejas de trigo. Notavelmente, o arroz é um ingrediente proeminente em cervejas de grandes marcas, como a Budweiser, que incorpora uma quantidade significativa de arroz. Os flocos de arroz, obtidos a partir da farinha umedecida e passada em rolos quentes, são uma forma comum de utilização. A adição de 30 % de milho como adjunto pode resultar em uma redução de até 8 % nas despesas gerais de produção, dependendo dos preços locais das matérias-primas e outros custos de produção²⁷.

O uso de milho, arroz e trigo em flocos como adjuntos na produção de cervejas Lager pode ter impactos nos atributos sensoriais, contribuindo para aprimorar a vida útil e a estabilidade da cerveja. Por exemplo, relatos indicam que o milho confere à cerveja um sabor completo e limpo, enquanto o arroz proporciona um sabor leve característico, resultando em uma bebida aprimorada^{1,27,29-31}.

É crucial ressaltar que a incorporação de adjuntos requer uma cuidadosa formulação da receita, uma vez que o equilíbrio entre os ingredientes é essencial para garantir a harmonia da cerveja. A qualidade dos adjuntos, o método de preparo e o momento exato de adição durante a produção são considerações fundamentais para atingir o resultado desejado.

2.6 Aditivos

Os aditivos desempenham um papel significativo na produção de cerveja, contribuindo para diversos aspectos, desde a estabilidade e qualidade até características sensoriais específicas. Embora a maioria das cervejarias produza cervejas sem a ajuda de aditivos, esses ingredientes adicionais podem ser utilizados com moderação para aprimorar a experiência do consumidor e garantir a consistência do produto¹.

Os aditivos a base de lúpulos quimicamente modificados são um grupo produzido por modificações químicas dos extratos de lúpulo. Utilizados, especialmente em cervejas industriais tipo lager, são adicionados pouco antes do envase, proporcionando benefícios como evitar *off-flavors*, adicionar um sabor amargo suave e controlável e melhorar a estabilidade da espuma¹.

Os aditivos destinados a aprimorar a estabilidade química da cerveja, como isinglass (derivada das bexigas natatórias de peixes) ou quitosana, desempenham um papel crucial no processo de clarificação do produto. Esses aditivos são adicionados antes da etapa de filtração,

eliminando partículas em suspensão e melhorando significativamente a aparência da cerveja. Além disso, outro estabilizador químico menos comum na produção de cerveja é a enzima papaína, comercializada sob o nome “Collupulin”. Quando introduzida na cerveja filtrada, essa enzima proteolítica degrada as proteínas, incluindo aquelas propensas a reagir com os polifenóis, o que poderia causar turbidez¹.

Os aditivos aprimoradores de estabilidade de sabor, conhecidos como antioxidantes, são fundamentais na produção de cerveja, especialmente em cervejas *Lager* de massa, prolongando sua vida útil. O ácido ascórbico (vitamina C), e sulfitos são amplamente utilizados como antioxidantes, reagindo com o oxigênio livre e prevenindo a oxidação de precursores, como aldeídos¹.

Na produção cervejeira, alguns cervejeiros incorporam aditivos como ácidos, como o ácido lático, para ajustar o pH, e sais, para modular a água. Agentes de espuma, como goma de guar, melhoram a formação e retenção da espuma, contribuindo para a estética e experiência sensorial. A adição de açúcares extras, como mel ou xaropes, influencia o teor alcoólico e sabor, enquanto corretivos de sabor e aroma podem ser usados em situações específicas¹.

É crucial observar que o uso de aditivos na produção de cerveja é uma prática sensível, e muitos cervejeiros artesanais preferem aderir à Lei da Pureza da Cerveja (*Reinheitsgebot*), que limita os ingredientes permitidos na fabricação de cerveja. A escolha de aditivos deve ser feita com sabedoria, levando em consideração o impacto na qualidade e na autenticidade da cerveja, além de atender a regulamentações e preferências dos consumidores^{1,5}.

3. PRODUÇÃO DA CERVEJA

Basicamente a produção da cerveja se dá em seis etapas (Figura 3): malteação, brassagem, fervura, fermentação, maturação e envase. Os cervejeiros chamam de brassagem o processo que vai da mosturação à fervura, passando pela filtração. A produção de cerveja é um processo que envolve várias etapas, cada uma desempenhando um papel crucial na criação da bebida apreciada globalmente¹.

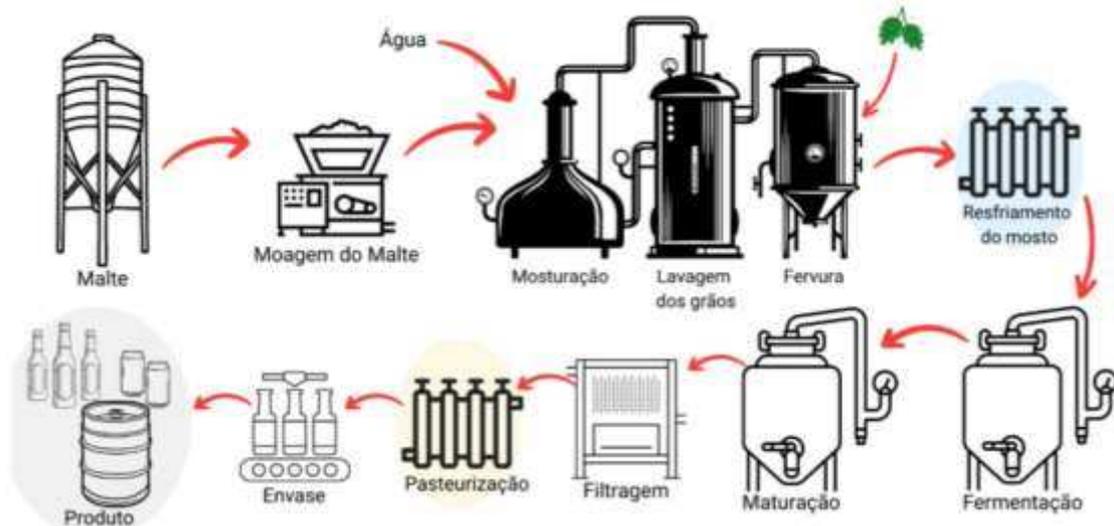


Figura 3: Etapas do processo de produção de cerveja. Variações e técnicas específicas podem ser aplicadas de acordo com o estilo desejado e as preferências do fabricante. Adaptado de ³².

A produção de cerveja inicia-se com a malteação, um processo fundamental composto por três etapas principais: maceração, germinação e torrefação. O termo "malteação" refere-se ao preparo do grão, como cevada, para se tornar o ingrediente principal na cerveja, e aqueles encarregados desse processo são conhecidos profissionalmente como malteadores. Na maceração, os grãos de cevada, liberados da dormência, passam por sucessivas imersões em água ao longo de aproximadamente dois dias para aumentar a umidade de 11 % para cerca de 43 % a 47 %. A germinação, parte essencial da malteação, ocorre quando os grãos são mantidos em condições propícias para incentivar seu desenvolvimento. Posteriormente, são secos em um secador e/ou torrador. Este processo é crucial para liberar as enzimas necessárias à conversão de amido em açúcares durante a brassagem, marcando o início da produção de cerveja^{1,10,33}.

A brassagem é uma etapa crucial no processo de produção de cerveja sucedendo a malteação. Essa fase desempenha uma função fundamental na definição das características essenciais da cerveja, incluindo teor alcoólico, corpo, sabor e dulçor, proporcionando-lhe complexidade e uma personalidade distintiva. Nessa fase, os grãos maltados são misturados com água aquecida resultando em um mosto rico em açúcares. As enzimas ativas durante essa etapa desempenham um papel crucial na criação do perfil de sabor da cerveja. A temperatura controlada durante a brassagem é fundamental, influenciando diretamente as características finais da bebida. Temperaturas mais baixas favorecem a atuação de enzimas alfa-amilase, produzindo açúcares mais fermentáveis e uma cerveja mais seca, enquanto temperaturas mais altas estimulam a atividade de enzimas beta-amilase, gerando açúcares menos fermentáveis e

uma cerveja mais encorpada e doce. Após a brassagem, o mosto é separado dos grãos por filtração e lavagem, sendo então direcionado para a etapa seguinte do processo, a fervura^{1,33}.

A fervura do mosto é uma fase essencial no processo cervejeiro, ocorrendo após a brassagem. Essa etapa desempenha um papel central na criação do perfil de sabor, amargor e aroma, contribuindo para as características distintas de cada estilo de cerveja. Durante essa etapa, o mosto resultante da brassagem é aquecido a altas temperaturas, eliminando micro-organismos indesejados e promovendo a esterilização. A adição de lúpulos durante a fervura contribui não apenas para o amargor, mas também para os aromas e sabores característicos da cerveja, conferindo-lhe complexidade. Além disso, a fervura induz a evaporação, concentrando os açúcares e outros constituintes, afetando diretamente o teor alcoólico e a consistência da cerveja. Ao final, o mosto é rapidamente resfriado, preparando-o para a fermentação.^{1,34}

A fermentação é o processo essencial em que as leveduras convertem açúcares em álcool, dióxido de carbono e calor. Após o resfriamento do mosto, este é transferido para um fermentador, onde as leveduras, principalmente da espécie *Saccharomyces*, são introduzidas. Elas transformam predominantemente os açúcares derivados da cevada malteada em álcool, dióxido de carbono e calor, formando a base alcoólica da cerveja. Além disso, as leveduras, juntamente com os açúcares e agentes flavorizantes, como o lúpulo, contribuem para criar os sabores e aromas característicos da cerveja. O sucesso da fermentação depende de vários fatores, incluindo a composição e concentração de oxigênio do mosto, a qualidade e quantidade de levedura inoculada, o controle preciso da temperatura no fermentador e o tempo de fermentação. A saúde da levedura é crucial para o processo, e a escolha adequada da cepa de levedura desempenha um papel fundamental, não apenas na produção de álcool, mas também na criação de características de sabor distintas, bem como na capacidade de tolerar subprodutos como o álcool e apresentar características específicas, como a agregação (floculação)^{23-25,35}.

Maturação é uma etapa crucial no processo de produção de cerveja, ocorrendo após a fermentação e sendo essencial para o desenvolvimento das características finais da bebida. Durante o período de maturação, a cerveja passa por um refinamento e amadurecimento, com interações químicas que contribuem para a harmonização e equilíbrio dos sabores. Essa fase compreende processos bioquímicos, químicos e reações físicas, muitos dos quais não são completamente compreendidos. Compostos indesejáveis, como diacetil, sulfeto de hidrogênio e acetaldeído, são reduzidos durante a maturação, seja pela ação contínua das leveduras ou por outras vias químicas orgânicas. Adicionalmente, a etapa de maturação resulta em clarificação, conferindo à cerveja uma aparência límpida e atraente. A duração desse processo varia conforme

o estilo desejado, podendo estender-se por semanas ou meses, especialmente em cervejas como lagers, que passam por períodos prolongados para desenvolver texturas suaves e características sensoriais complexas. Durante esse estágio, a cerveja pode passar por processos de carbonatação natural, contribuindo para a efervescência desejada. Após a maturação, a cerveja está pronta para o envase em garrafas, barris ou latas, marcando o final do processo de produção e garantindo qualidade e consistência para os apreciadores de cerveja.^{1,34,36}

Na etapa final do processo de produção de cervejas, o envase é o momento em que a bebida é transferida para recipientes apropriados para distribuição e consumo. Nesse estágio, a cerveja atinge sua maturidade e está pronta para ser apreciada pelos consumidores. Garrafas, barris e latas são os recipientes mais comuns, cada um contribuindo com características específicas que podem influenciar o perfil da cerveja final. Garrafas de vidro são conhecidas por preservar sabores e aromas, barris são frequentemente utilizados em sistemas de distribuição para bares e restaurantes, enquanto as latas são apreciadas pela portabilidade e pela capacidade de proteger a cerveja da luz, garantindo uma durabilidade prolongada. Durante o envase, a cerveja pode passar por processos adicionais, como carbonatação, que contribui para a efervescência desejada. Além disso, nessa fase, a cerveja é frequentemente filtrada para remover possíveis sedimentos, garantindo uma aparência límpida. O envase também representa o momento em que a cerveja é rotulada e embalada para distribuição, apresentando rótulos atrativos e informativos que fornecem detalhes sobre estilo, teor alcoólico e ingredientes aos consumidores¹.

4. AS DIRETRIZES DE ESTILOS BJCP (BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM)

A BJCP, ou Beer Judge Certification Program, é uma organização internacional dedicada a promover a apreciação e a compreensão da cerveja através da educação e certificação de juízes de cerveja. Fundada em 1985 nos Estados Unidos, a BJCP estabeleceu padrões rigorosos para a avaliação de cervejas em competições, ajudando a garantir a consistência e a qualidade das avaliações em todo o mundo⁵.

Ao longo dos anos, a BJCP tem desempenhado um papel fundamental na promoção da excelência na produção de cerveja e na educação do público sobre os diferentes estilos de cerveja disponíveis. Seu compromisso com os mais altos padrões de qualidade e profissionalismo continuará a desempenhar um papel vital no crescimento e desenvolvimento da indústria cervejeira artesanal em todo o mundo. É reconhecida por sua abordagem meticulosa na classificação das cervejas, incluindo as da família Lager. Dentro dessa família, a BJCP identifica

diversos estilos distintos, cada um com características únicas que refletem a diversidade dessa categoria tão ampla e popular⁵.

As cervejas Lager são conhecidas por sua fermentação de baixa temperatura e uso de leveduras específicas, resultando em uma ampla gama de sabores, aromas e características. Aqui estão alguns dos principais estilos de cerveja Lager reconhecidos pela BJCP e como eles são classificados⁵:

4.1 Standard American Beer:

Essa classificação engloba as cervejas americanas de consumo diário, amplamente apreciadas pelos aficionados por cerveja. Incluindo tanto ales quanto Lagers, essas cervejas não se destacam por sua complexidade, apresentando sabores suaves e acessíveis. Geralmente, compartilham características semelhantes às das Lagers ou são desenvolvidas visando atrair os consumidores habituais desse tipo de cerveja⁵.

4.1.1. American Light Lager

Uma Lager altamente carbonatada, com corpo extremamente leve, apresentando uma tonalidade que varia de palha muito clara a amarelo pálido, esta cerveja exibe uma espuma branca e efervescente que geralmente não persiste, destacando sua notável transparência. No aroma, uma presença de malte é facultativa, mas pode sugerir notas granuladas, doces ou até mesmo reminiscências de milho, se presente, acompanhada por um leve toque de lúpulo picante, floral ou herbáceo, embora sua detecção possa ser rara. O paladar é predominantemente neutro, com um final crocante e seco e um sabor granulado ou de milho de baixo a muito baixo, que pode parecer ligeiramente doce devido ao baixo amargor. A presença de lúpulo, também opcional, geralmente é sutil demais para ser percebida, com um amargor que varia de baixo a muito baixo, mantendo-se em geral próximo do equilíbrio entre o maltado e o amargo. O perfil de fermentação limpo é uma característica distintiva, complementado pelos ingredientes característicos, que incluem cevada de duas ou seis fileiras, com até 40% de arroz ou milho como adjuntos, além de enzimas adicionais que podem ainda mais suavizar o corpo e reduzir os carboidratos, levedura Lager e um uso mínimo de lúpulo⁵.

4.1.2. American Lager

Uma lager extremamente clara, altamente carbonatada e de corpo leve, destaca-se por um perfil de sabor notavelmente neutro e baixo amargor. Com uma coloração que varia de palha muito clara a amarelo médio e uma espuma branca e efervescente que geralmente não perdura,

essa cerveja exibe uma notável transparência. Os ingredientes típicos incluem cevada de duas ou seis fileiras, com até 40% de arroz ou milho como adjuntos, além de levedura Lager e um uso leve de lúpulo. No aroma, pode-se perceber um teor baixo de malte, podendo revelar notas granuladas, doces ou semelhantes ao milho, enquanto um leve toque de lúpulo, com características picantes ou florais, também pode estar presente. O paladar é predominantemente neutro, com um sabor de lúpulo moderadamente baixo que pode apresentar nuances florais, picantes ou herbáceas, e um amargor geralmente baixo a médio-baixo, mantendo-se próximo do equilíbrio entre maltado e amargo. O perfil de fermentação é caracteristicamente limpo, típico das leveduras Lager⁵.

4.2. International Lager

As cervejas internacionais representam uma categoria de cervejas premium, industriais e de mercado de massa, encontradas em grande parte dos países ao redor do globo. Sejam elas inspiradas em estilos americanos ou europeus, todas compartilham um caráter notavelmente uniforme e são amplamente comercializadas. Originadas das cervejas tipo Pilsner originais, essas cervejas apresentam variações de cor e sabor, muitas vezes incorporando nuances adicionais de malte. Em muitos países, os estilos são denominados pelos nomes locais, refletindo as preferências e tradições regionais. Embora o termo "internacional" não seja necessariamente usado como rótulo, ele serve como uma categorização para cervejas similares produzidas em diversos locais ao redor do mundo⁵.

4.2.1. International Pale Lager

Uma pale lager altamente atenuada, caracterizada por sua ausência de sabores intensos, sendo tipicamente bem equilibrada e altamente carbonatada. Apresentando uma cor que varia de palha clara a dourada e uma espuma branca e efervescente que pode desaparecer rapidamente, esta cerveja revela-se excepcionalmente translúcida. No aroma, são percebidos níveis baixos a médio-baixos de malte granulado-maltado ou levemente biscoito-doce, juntamente com um aroma de lúpulo muito baixo a médio, com notas picantes, florais ou herbais, mantendo um perfil de fermentação limpo. Os sabores são marcados por níveis baixos a moderados de malte granulado, com um amargor médio-baixo a médio, e um final, seco e bem atenuado. O sabor de lúpulo, também opcional, pode apresentar notas florais, picantes ou herbais, com um equilíbrio geralmente próximo do ponto de equilíbrio entre o maltado e o amargo. O retrogosto é neutro, com leves nuances de malte e ocasionalmente de lúpulo. Os ingredientes característicos incluem

cevada de duas ou seis fileiras, com a possibilidade de uso de arroz, milho ou açúcar como adjuvantes, embora predominantemente seja utilizado malte⁵.

5. ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial é a aplicação científica destinada a obter, medir, avaliar e interpretar as respostas dos degustadores a características específicas de alimentos, bebidas ou outros produtos não alimentares, conforme percebidos pelos sentidos humanos. No contexto da cerveja, essa abordagem desempenha um papel crucial na avaliação das características sensoriais discerníveis pelos consumidores, incluindo sabor, aroma, aparência e sensação na boca. O processo envolve a participação de painelistas, degustadores treinados, que utilizam seus sentidos para oferecer insights valiosos sobre a qualidade e as nuances sensoriais da cerveja^{37,38}.

No âmbito da cerveja, a análise sensorial engloba diversas dimensões. O gosto é minuciosamente avaliado em termos de doçura, amargor, acidez e outros elementos que contribuem para a complexidade gustativa da cerveja. O aroma, frequentemente um dos atributos mais distintivos, é categorizado em notas maltadas, lupuladas, frutadas, entre outras. A textura refere-se à sensação na boca, abrangendo aspectos como efervescência, cremosidade e percepção do álcool. A análise visual examina a aparência da cerveja, considerando características como cor, transparência e formação e retenção de espuma³⁹⁻⁴¹.

A condução da análise sensorial segue rigorosos protocolos padronizados, sendo frequentemente realizada de maneira controlada. Os painelistas recebem treinamento específico para reconhecer e descrever características sensoriais de maneira consistente, contribuindo para a objetividade nas avaliações. Essa abordagem é vital para a indústria cervejeira, proporcionando informações cruciais para aprimorar receitas, manter a consistência da qualidade e desenvolver novos produtos alinhados às preferências dos consumidores^{40,42,43}.

Existem três grupos de testes que auxiliam na avaliação das características sensoriais, cada um com objetivos distintos: testes de discriminação, teste de descrição e testes hedônicos. Dentre os métodos sensoriais mais comuns, os testes descritivos e de escala hedônica, conhecidos como Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), são amplamente utilizados em estudos que buscam identificar e quantificar diferenças nos atributos sensoriais das amostras de cerveja, combinando resultados com análises instrumentais analíticas^{38,44}.

Em resumo, a análise sensorial na cervejaria representa uma prática essencial que harmoniza ciência e arte. Ela proporciona uma compreensão aprofundada das características sensoriais da cerveja, capacitando os produtores a ajustarem e aprimorar seus produtos, atendendo aos padrões de qualidade e às expectativas dos apreciadores.

5.1 Análise Descritiva Quantitativa

A Análise Descritiva Quantitativa destaca-se como um método amplamente empregado na identificação e quantificação dos atributos sensoriais em diversos alimentos e bebidas. Essa abordagem oferece uma descrição abrangente das propriedades sensoriais de um produto, destacando-se como um dos métodos mais completos e sofisticados para a caracterização de atributos cruciais. Ao aplicar a ADQ, é possível determinar o perfil sensorial descritivo dos produtos avaliados, identificando a intensidade com que cada característica se manifesta, o que permite destacar as diferenças sensoriais entre eles^{45,46}.

Para interpretar os dados obtidos nos testes sensoriais, são utilizadas ferramentas estatísticas apropriadas, fornecendo uma compreensão mais clara das relações entre todas as amostras e os atributos que as descrevem. Essas análises estatísticas não apenas caracterizam as amostras de forma geral, mas também revelam diferenças e similaridades específicas em termos dos atributos avaliados⁴⁷.

A ADQ envolve um painel de degustadores treinados, conhecidos como "panelistas", que utilizam um vocabulário padronizado para descrever e quantificar características sensoriais específicas de uma amostra de cerveja. Esses panelistas passam por um treinamento intensivo para estabelecer uma linguagem sensorial comum, garantindo consistência nas avaliações. A metodologia compreende três etapas fundamentais: i) o levantamento de atributos e a familiarização dos avaliadores com os produtos; ii) a definição, em consenso com a equipe de avaliadores, dos termos descritores e a fixação das referências que servirão como padrões de intensidade (mínima e máxima) para cada atributo, e iii) a avaliação das amostras utilizando, normalmente, uma escala não estruturada de nove centímetros para quantificação da intensidade dos atributos sensoriais. Os dados gerados são transformados em médias de intensidade, por atributo, e avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA). Nos casos em que diferenças entre as amostras são observadas, testes de comparação de médias, usualmente o Teste de Tukey, são realizados^{45,46,48}.

No contexto específico da cerveja, a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) engloba a quantificação de atributos como amargor, dulçor, notas maltadas, lupuladas, frutadas, entre

outros, permitindo uma análise minuciosa dos perfis sensoriais e contribuindo para um entendimento detalhado das nuances que diferenciam diversos estilos de cerveja. Durante as sessões de ADQ para cerveja, os panelistas avaliam várias dimensões sensoriais, incluindo sabor, aroma, textura e aparência, com cada atributo meticulosamente definido e pontuações ou descritores quantitativos atribuídos às amostras pelos panelistas, resultando em uma avaliação mais precisa e mensurável das características sensoriais ^{40,42,49-51}.

A ADQ não apenas fornece dados quantitativos sobre as características sensoriais, mas também auxilia os produtores a ajustarem e aprimorem suas receitas. A compreensão detalhada das preferências dos consumidores e a capacidade de reproduzir consistentemente determinados perfis sensoriais são benefícios significativos proporcionados por essa abordagem ^{45,46,52}.

Em síntese, a Análise Descritiva Quantitativa representa uma ferramenta valiosa na cervejaria e em outras indústrias alimentícias, possibilitando uma avaliação precisa e mensurável das características sensoriais dos produtos. Essa metodologia desempenha um papel fundamental na garantia de qualidade, no desenvolvimento de produtos personalizados e na satisfação do consumidor.

6. COMPOSTOS AROMÁTICOS

Os compostos aromáticos representam uma classe diversificada de substâncias químicas orgânicas, voláteis e semi-voláteis, que são vapores perceptíveis pelo olfato. Encontrados em uma ampla variedade de fontes, como plantas, frutas, especiarias, ervas, flores e até mesmo em alguns minerais, cada composto aromático contribui com notas específicas, formando uma intrincada sinfonia de aromas detectáveis pelo nosso sistema olfativo. Esses compostos desempenham um papel crucial ao conferir perfis distintos de aroma e sabor a alimentos e bebidas, tornando-se elementos-chave na experiência sensorial ^{41,42,50,52,53}.

Na produção de cervejas, é relevante observar que já foram identificados entre 1.000 e 2.000 compostos, incluindo álcoois, ésteres, cetonas, aldeídos, ácidos orgânicos, ácidos carboxílicos, compostos de enxofre, fenóis, aminas, entre outros. Essa diversidade é resultado de reações complexas, sendo que os compostos voláteis desempenham um papel fundamental no perfil aromático da cerveja, enquanto os não voláteis, como antocianinas e componentes fenólicos, influenciam atributos sensoriais como cor, espuma, sabor ou sensação na boca, contribuindo significativamente para a qualidade da cerveja. Os lúpulos, por sua vez, são uma

fonte rica desses compostos aromáticos, proporcionando desde notas florais e cítricas até toques mais resinosos. Além disso, a escolha das cepas de leveduras e o processo de fermentação também exercem influência sobre a presença de ésteres e fenóis, contribuindo para a complexidade sensorial da cerveja⁵⁴⁻⁵⁶.

A análise e compreensão desses compostos aromáticos tornaram-se áreas de estudo cruciais, não apenas para aprimorar a qualidade sensorial de alimentos e bebidas, mas também para o desenvolvimento de novos produtos, segurança alimentar e a compreensão das preferências dos consumidores. Técnicas como a Microextração em Fase Sólida, a Cromatografia Gasosa e a Espectrometria de Massa, são frequentemente empregadas em métodos para identificar e quantificar esses compostos⁵⁶⁻⁵⁸.

7. PREPARO DE AMOSTRAS

A análise de alimentos desempenha um papel crucial na avaliação do valor nutricional, controle de qualidade de produtos frescos e processados, bem como no monitoramento de aditivos alimentares e contaminantes tóxicos. O sabor, uma combinação de paladar e olfato, é um fator determinante na aceitação dos alimentos pelos consumidores. O sabor, especialmente nas frutas, é sensível a alterações na composição, sendo os compostos aromáticos voláteis essenciais na formação do aroma durante o amadurecimento, colheita, pós-colheita e armazenamento. A produção desses compostos está sujeita a vários fatores, como espécie, variedade e processos tecnológicos. O monitoramento de adulterações é vital para garantir a integridade dos alimentos e a saúde do consumidor, pois os alimentos podem deteriorar-se devido a fatores como luz, calor, oxidação e contaminação durante o armazenamento^{59,60}.

No contexto das amostras alimentares, a etapa de preparo desempenha uma função crucial em análises laboratoriais, visando obter informações precisas sobre a composição e qualidade dos produtos alimentícios. O sucesso do procedimento final está intrinsecamente ligado à compreensão abrangente do processo de análise, considerando as propriedades físico-químicas dos analitos e a matriz da amostra. Essa fase é essencial para garantir resultados confiáveis, seja para monitorar a conformidade com padrões regulatórios, garantir a qualidade do produto ou conduzir pesquisas científicas⁶¹⁻⁶³.

A complexidade das amostras de alimentos, que tipicamente abrigam uma diversidade de componentes, como compostos aromáticos, proteínas, aminoácidos, açúcares, entre outros, demanda procedimentos de preparo específicos. Esses procedimentos visam extrair os analitos

de interesse e eliminar possíveis interferências. Durante o preparo de amostras, vários fatores são levados em consideração, tais como a matriz alimentar, a natureza dos analitos, as características físico-químicas e o propósito da análise⁶⁴⁻⁶⁶.

Dentre os métodos amplamente utilizados para o preparo de amostras alimentares, destacam-se a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). Na LLE, os analitos extraídos, são dissolvidos em um solvente orgânico imiscível com a matriz, enquanto a SPE utiliza fases estacionárias sólidas que permitem a remoção de interferências antes da análise instrumental. Adicionalmente, técnicas modernas como a QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*) foram desenvolvidas para o preparo de amostras de alimentos, especialmente para a análise de resíduos de pesticidas em produtos agrícolas. Essa abordagem combina extração com solventes e uma fase de purificação, proporcionando eficiência e simplicidade ao processo^{61,67,68}.

No âmbito das análises de aroma, técnicas baseadas no enriquecimento do *headspace*, como a microextração em fase sólida (SPME), têm se destacado. Comparada a métodos convencionais, a HS-SPME é uma técnica que reflete com exatidão a composição básica dos componentes voláteis nas amostras analisadas, integrando amostragem, extração, concentração e injeção em um único passo. No contexto da análise de Compostos Orgânicos Voláteis (VOC) em cervejas, a microextração em fase sólida por *headspace* (HS-SPME) se destaca como uma das abordagens mais adequadas. Essa técnica, além de possibilitar a automação dos processos e dispensar o uso de solventes orgânicos prejudiciais ao ambiente, é capaz de refletir com exatidão a composição básica dos componentes voláteis nas amostras analisadas^{65,68-70}.

Em resumo, o preparo de amostras representa uma etapa crítica em análises científicas, impulsionando a busca por métodos mais eficientes, sustentáveis e precisos. A precisão típica da SPME, com coeficientes de variação (CV) frequentemente situados na faixa de 5-15% para compostos voláteis em análises cromatográficas, reflete a contínua evolução nesse campo, promovendo resultados mais confiáveis e ambientalmente responsáveis.

7.1 Microextração em Fase Sólida (SPME)

Desde sua introdução no início da década de 1990, a Microextração em Fase Sólida (SPME) tem sido reconhecida como uma abordagem simples e altamente eficaz para a preparação de amostras, integrando amostragem, extração, limpeza e enriquecimento em uma única etapa. Na SPME, o intuito não é transferir exaustivamente os analitos da matriz para a fase

de extração; pelo contrário, ela isola quantidades de analitos proporcionalmente à sua concentração livre na amostra.

Após a etapa de extração, os analitos são desorvidos por meio de métodos térmicos, líquidos ou baseados em laser, sendo então introduzidos em instrumentação analítica apropriada para separação e/ou detecção ^{65,66,71}. Os dispositivos para SPME consistem em uma pequena quantidade de fase de extração imobilizada em um suporte sólido. Nesse método, os analitos presentes no meio da amostra, seja ele no estado gasoso, líquido ou sólido, são extraídos e enriquecidos nesse revestimento por meio de partição entre a matriz da amostra e a fase de extração.

A SPME apresenta vantagens significativas em relação aos métodos tradicionais de preparação de amostras, destacando-se pela simplicidade, eficiência e seletividade, facilidade de automação, respeito ao meio ambiente e versatilidade. Ela tem sido amplamente empregado para a pré-concentração e extração de analitos-alvo em uma variedade de amostras, destacando-se em aplicações alimentares, ambientais e biológicas ⁷¹⁻⁷³.

7.1.1 Dispositivo para SPME

Existe uma grande variedade de diferentes formatos para dispositivos de SPME, especialmente fibras e tubos capilares. Dentre essas categorias, as fibras destacam-se como a geometria mais amplamente utilizada, devido à facilidade de preparação para a extração, capacidade de extração sem solvente e adaptabilidade a uma variedade de instrumentos analíticos. Para uso, as fibras são montadas em dispositivos de suporte (*holders*). Há duas variantes do dispositivo do SPME: uma para operação manual e outra para utilização com amostradores automáticos ou interfaces específicas. O conjunto de fibra é constituído por um núcleo de fibra conectado através de um *hub* a uma haste guia de aço inoxidável. Esta haste guia é encapsulada em uma agulha oca que perfura o septo do frasco de amostra. Durante o processo de extração, a fibra é empurrada para fora dessa agulha e, quando não está em uso, é retraída. O núcleo de fibra é revestido com uma fase estacionária, geralmente de 1 ou 2 cm de comprimento, e pode ser feito de sílica fundida (mais susceptível a quebras), *StableFlex* (uma combinação de sílica fundida de 80 µm com polímero plástico de 20 µm, reduzindo as chances de quebra, mas com uma limitação térmica de 320 °C), ou uma liga metálica (sem limitações térmicas, apenas para uso com sistemas *Microseal* sem septo). As fibras destinadas ao uso manual apresentam agulhas de calibre 24, com um diâmetro externo de 565 µm, sendo este o menor tamanho possível que ainda permite a retração da fase estacionária de 100 µm de espessura. Já para

amostradores automáticos, são aconselháveis agulhas de calibre 23, disponíveis com um diâmetro externo de 646 μm .

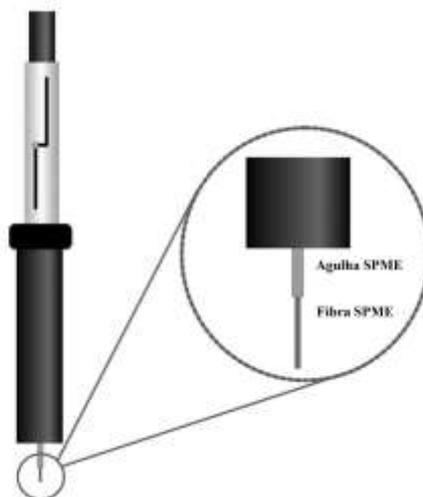


Figura 4: Esquema do suporte para SPME (*holder*) e fibra. Este foi o primeiro dispositivo comercial de SPME desenvolvido pela Supelco. Adaptado da referência⁷⁴.

Ambos os conjuntos de dispositivos, que incluem as fibras, são utilizados com frascos de amostra equipados com tampas contendo finos septos de silicone, os quais garantem uma vedação hermética ao redor da agulha durante o processo de perfuração. A Figura 1 ilustra a configuração do dispositivo de SPME.

7.1.2 Modos de Amostragem em SPME

Existem três modos de extração por SPME: o modo de imersão direta (DI), em que a fibra é diretamente inserida na amostra; o modo de *headspace* (HS), no qual a fibra é introduzida na área acima da amostra; e amostragem através de membrana de proteção para amostras sujas. A análise de VOC é realizada através do modo DI para matrizes gasosas, ou HS, que é o modo mais eficiente para extrair analitos de líquidos complexos e amostras sólidas (com interferências de alto peso molecular, como proteínas), além de permitir a coleta de compostos voláteis em geral.

7.1.3 Fibras de SPME

Existem tradicionalmente quatro polímeros comercialmente utilizados como fases estacionárias em SPME: divinilbenzeno (DVB), polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA) e carbowax-poli(etilenoglicol) (PEG). Esses polímeros podem ser empregados individualmente (em diferentes espessuras de revestimento) ou em combinação, misturados com carboxeno (CAR). As fases estacionárias variam em polaridade (polar, bipolar, não polar) e no mecanismo de

extração (absorvente ou adsorvente). interação entre a fibra e o analito para os dois tipos de mecanismos de extração ^{66,75}.

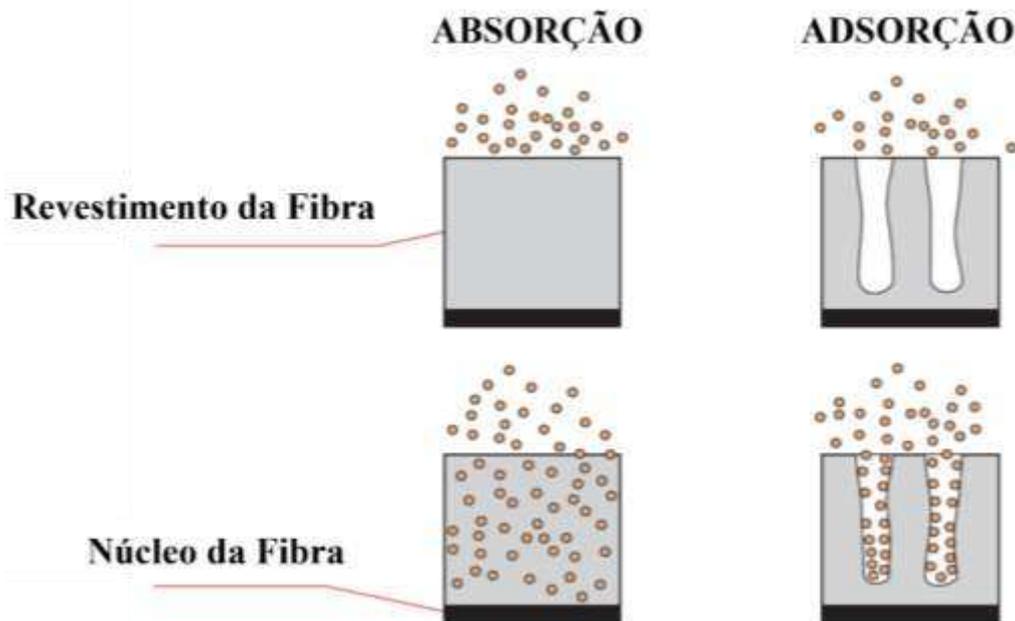


Figura 5: Mecanismos de extração para revestimentos de fibra absorventes (líquidos) e adsorventes (sólidos). Adaptado da referência ⁷⁶.

O absorvente consiste em um polímero com propriedades líquidas ligado em várias espessuras ao núcleo da fibra. Nesse tipo de revestimento, as análises percorrem a fase estacionária, sendo atraídas com base em sua polaridade (Figura 2). A retenção está principalmente relacionada à espessura da fase estacionária. Moléculas analisadas de maior tamanho são retidas por um período mais prolongado no revestimento, já que atravessam mais lentamente do que moléculas menores. O revestimento com fase mais espessa resulta em maior retenção de moléculas menores, sendo a escolha da espessura dependente do tamanho das moléculas analisadas. Comercialmente, existem três tipos de fases estacionárias do tipo absorvente disponíveis: PDMS não polar, PA moderadamente polar e PEG polar. ^{61,67,73,76}

Revestimentos do tipo adsorvente envolvem a ligação de um polímero poroso sólido, carbono poroso ou sílica a um material líquido revestido em um núcleo de fibra. Na amostra, as moléculas percorrem os poros do adsorvente, interagindo com suas partículas por meio de ligações de hidrogênio, ligações ou interações de van der Waals (Figura 2). A retenção nesse caso baseia-se no tamanho das moléculas da amostra, no diâmetro dos poros e na quantidade de porosidade. Os poros são classificados em três tipos: macro (aberturas com $> 500 \text{ \AA}$), meso (aberturas $20\text{-}500 \text{ \AA}$) e micro ($2\text{-}20 \text{ \AA}$). Um poro retém uma molécula de amostra com metade do tamanho do diâmetro do poro ⁷⁷.

Comercialmente, há três tipos de fases estacionárias do tipo adsorvente disponíveis, usadas para a extração de Compostos Orgânicos Voláteis: PDMS, CAR-PDMS, PDMS-DVB e DVB-CAR-PDMS. As fibras CAR-PDMS, desenvolvidas para extração de substâncias voláteis, destacam-se pela eficiência na retenção de analitos de até 3 carbonos. O revestimento DVB-CAR-PDMS otimiza a extração de hidrocarbonetos de diferentes tamanhos. A fibra PDMS-DVB é selecionada para estudos direcionados a aldeídos e em análises de hidrocarbonetos não polares, apresentando limites de detecção relativamente baixos. A complementaridade dessas fibras destaca-se na detecção eficiente de compostos específicos, contribuindo para uma análise abrangente e eficaz^{61,70,73,76}.

7.1.4 Parâmetros operacionais em SPME

A sensibilidade de SPME pode ser melhorada através da otimização das condições da matriz, tempo de extração, proporção de fase (no caso da extração através do *headspace*), temperatura, agitação da amostra e força iônica. O tempo de extração geralmente representa o fator mais limitante na SPME e, portanto, é um dos principais parâmetros a serem estudados. Pode ser reduzido por meio de uma agitação eficiente de soluções aquosas e/ou aumento de temperatura. No entanto, embora temperaturas mais elevadas resultem em uma liberação mais eficiente de compostos da matriz, o aumento na temperatura simultaneamente causa uma perda de sensibilidade, já que as constantes de distribuição diminuem. Isso significa que o equilíbrio é alcançado mais rapidamente, mas a quantidade de analito extraído é menor nesse equilíbrio⁷³.

A agitação reduz o tempo necessário para alcançar o equilíbrio e melhora a sensibilidade na pré-equilíbrio, pois aumenta o transporte de massa entre a amostra e a fase estacionária da fibra. A proporção de fase refere-se à relação entre o volume gasoso e o volume da amostra no frasco. Valores menores dessa relação proporcionam maior sensibilidade ao modo de *headspace*^{67,69}.

Portanto, o volume do *headspace* deve ser mantido o mais reduzido possível para alcançar uma sensibilidade mais elevada, pois isso diminui o tempo de equilíbrio e aumenta a massa do composto extraído pela fibra, aprimorando os limites de detecção. Quanto maior o volume de *Headspace*, mais do composto analisado é direcionado para o *headspace*, resultando em uma menor quantidade indo para a fibra e permanecendo na fase sorvente⁷⁷.

A força iônica da amostra é alterada pela adição de sal, podendo influenciar a extração de duas maneiras: modificando as propriedades do limite de fase ou gerando um efeito de *salting-out*. Este último refere-se à diminuição da solubilidade de analitos hidrofóbicos na fase aquosa,

sendo mais comumente observado. Esse processo melhora a sensibilidade ao formar esferas de hidratação através de moléculas de água com íons salinos, impulsionando moléculas adicionais da amostra para o *headspace* devido à redução na concentração de moléculas de água disponíveis para dissolver os compostos analisados⁷⁷.

No entanto, em concentrações mais elevadas de sais, pode ocorrer o oposto desse processo. Interações eletrostáticas entre moléculas analisadas e pares de sal iônico na solução podem reduzir o passagem das moléculas para o *headspace*. Em geral, a adição de sal aumenta a extração de compostos polares, mas tem pouco efeito sobre a polaridade de compostos não polares.

7.1.5 Microextração em fase sólida por *Headspace*

A HS-SPME é uma técnica analítica amplamente empregada na extração e análise de compostos voláteis presentes em amostras complexas. Reconhecida por sua simplicidade, sensibilidade e eficiência, tornou-se uma escolha preferencial em diversas áreas, incluindo análise de alimentos, ambiental e clínica^{72,73}.

O processo inicia-se com a introdução de uma fibra revestida por uma fase estacionária na cabeça do frasco de amostra, onde os compostos voláteis difundem-se para o *headspace*. A fibra SPME atua como um sorvente, capturando os analitos voláteis presentes nesse espaço, A Figura 3 apresenta a configuração da HS-SPME^{70,77}.

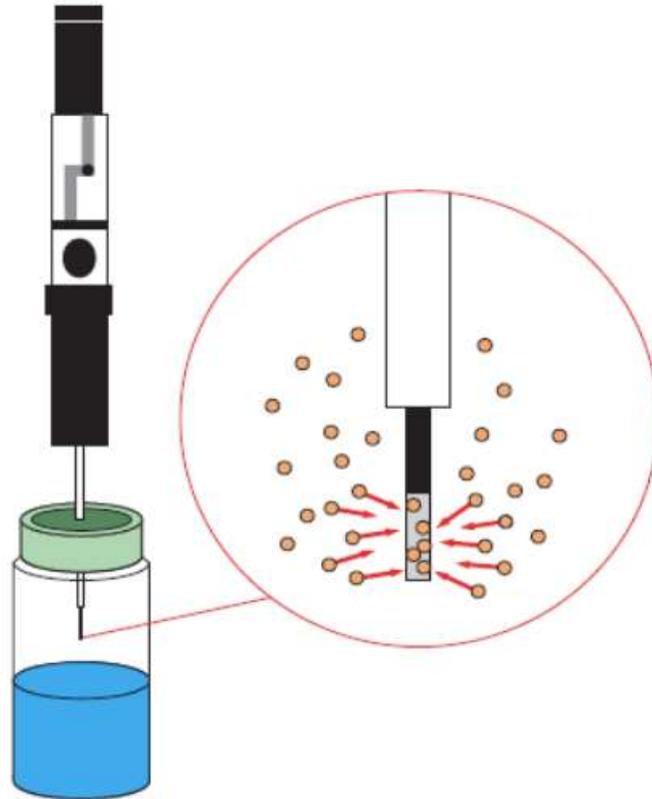


Figura 6: Configuração da extração por Microextração em Fase Sólida de *Headspace*. Adaptado da referência⁷⁶.

Na análise de alimentos, especialmente em bebidas alcoólicas, a HS-SPME destaca-se pela sua aplicação abrangente. Essa metodologia permite a extração seletiva de compostos voláteis revelando sua composição aromática e seu *fingerprints*.⁶⁴ Essa análise é essencial para identificar e comparar perfis ou padrões que podem variar em resposta a mudanças na composição, armazenamento, processamento e outras características do produto alimentar⁷⁸.

No caso específico das cervejas, a HS-SPME torna-se essencial para investigar o perfil volátil dessas bebidas complexas e apreciadas^{66,75,79-81}. A composição aromática desses produtos, que compõe o *fingerprints* das cervejas, é atribuída a uma diversidade de compostos presentes em concentrações variáveis. Essa abordagem contribui para a caracterização detalhada do perfil de compostos, sendo crucial para a compreensão da qualidade sensorial, consistência e autenticidade das cervejas produzidas.⁸²⁻⁸⁸

Ao utilizar a HS-SPME na análise de amostras alimentares, como a cerveja, a técnica oferece uma prolongada vida útil da fibra extratora, desempenhando um papel crucial na eficiência da extração dos compostos voláteis. A seleção cuidadosa do material de revestimento

da fibra desempenha um papel fundamental no desempenho da extração dos analitos-alvo na HS-SPME^{52-55,72,79,81}.

Atualmente, as pesquisas para analisar o perfil de sabor e aroma concentram-se na análise dos VOC de cervejas, isolados por HS-SPME e analisados por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (GC-MS). No entanto, a aplicação da Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplados a Espectrometria de Massas (GC×GC-MS) tem emergido como uma alternativa poderosa para caracterizar o perfil de voláteis em amostras alimentícias, proporcionando maior resolução cromatográfica e aumento na sensibilidade⁸⁴⁻⁹³.

8. GC-MS

A cromatografia é uma técnica analítica amplamente empregada para separar e identificar os componentes presentes em uma amostra. Essa metodologia baseia-se na distribuição diferencial dos constituintes entre uma fase estacionária e uma fase móvel. Na cromatografia gasosa (GC), é crucial que os componentes sejam voláteis e termicamente estáveis. Caso contrário, a derivação pode ser necessária para conferir essas propriedades, embora nem sempre seja uma solução viável⁹⁴⁻⁹⁶.

No GC, a separação de misturas ocorre pela exploração das diferenças na distribuição dos componentes entre duas fases: a fase estacionária e a fase móvel, comumente conhecida como gás de arraste. A fase do gás de arraste desempenha um papel secundário na separação, servindo apenas como meio de transporte dos componentes da amostra através da coluna. O hélio, devido à sua inércia no sistema cromatográfico e nas fontes de ionização dos detectores de espectrometria de massa, tem se destacado como um gás de arraste de fase móvel especialmente adequado para aplicações de GC. No entanto, sua falta de sustentabilidade e natureza não renovável tem impulsionado a busca por métodos baseados em gases transportadores alternativos, como nitrogênio ou hidrogênio^{94,96,97}.

O mecanismo principal de separação é governado pelas pressões de vapor dos componentes da amostra e sua sorção para a fase estacionária. Uma amostra da mistura a ser separada é introduzida na fase gasosa em movimento pouco antes de encontrar a fase estacionária. A separação dos componentes é determinada pelas diferenças em seus equilíbrios entre as duas fases. Componentes com baixa afinidade pela fase estacionária passam mais tempo na fase móvel do gás de arraste, resultando em tempos de retenção mais curtos^{94,96-98}.

Como resultado, a maioria das separações por GC hoje em dia é conduzida por meio de programação de temperatura. A análise começa em uma temperatura baixa, adequada para os componentes mais voláteis da amostra. À medida que a análise avança, a temperatura é aumentada linearmente até atingir um nível apropriado para os componentes menos voláteis. Nessa abordagem, cada composto começa a migrar rapidamente à medida que a temperatura atinge seu ponto adequado, resultando em eficiências cromatográficas notáveis^{95-97,99}.

A plataforma analítica mais comumente utilizada para perfis voláteis é a GC-MS, que utiliza uma coluna capilar. A ligação de um espectrômetro de massa a um cromatógrafo a gás é uma abordagem frequentemente empregada para a identificação e quantificação precisa de compostos, especialmente em análises de *fingerprints*¹⁰⁰.

O *fingerprints* da fração volátil de uma amostra é obtido por inspeção de cromatogramas complexos assimilados a impressões digitais (perfil bem definido e que discrimina a substância com características únicas/particulares) das amostras analisadas. Portanto, o uso de uma instrumentação analítica de maior sensibilidade é requerido para detectar e quantificar compostos orgânicos como ácidos, acetonas, alcanos, álcoois, ésteres e fenóis que pertencem a classe de compostos que constituem o aroma e sabor das cervejas, podem indicar a qualidade da matéria prima utilizada pela indústria na fabricação^{96,101}.

No entanto, essa abordagem pode enfrentar desafios na identificação confiável de componentes únicos, especialmente aqueles de baixa massa molecular. Esses desafios são principalmente decorrentes da sobreposição parcial ou total de picos e da presença de componentes com estruturas químicas semelhantes, resultando em espectros de massa semelhantes^{94,95,98,99}.

9. GC×GC

Embora a cromatografia gasosa tenha sido uma ferramenta essencial por muitos anos na análise de diversas amostras, a análise GC unidimensional (¹D) enfrenta desafios, como a coeluição de componentes, que limitam a identificação e quantificação corretas dos analitos individuais. Para contornar essa limitação, têm sido aplicadas técnicas de cromatografia gasosa bidimensional em diversas análises para obter *fingerprints*^{64,102-114}. A cromatografia gasosa bidimensional (2DGC) submete a amostra a duas etapas independentes de separação. Os componentes da coluna da primeira dimensão (¹D) são reanalisados pela coluna da segunda dimensão (2D) com diferente seletividade de fase estacionária, buscando aumentar

significativamente a capacidade de pico, ou seja, o número de picos teóricos que podem ser acomodados no espaço de separação (cromatograma). A técnica é capaz de aprimorar o desempenho da separação ao aumentar a capacidade de pico, resolver idealmente problemas de coeluição, remover a matriz subjacente ou compostos interferentes e determinar compostos presentes em pequena abundância por meio do aprimoramento da criofocagem^{95-99,115-117}.

Duas variantes do 2DGC são o 2DGC convencional de *heartcuts* (GC-GC) e a cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC). A GC-GC proporciona análises direcionada, onde pequenas porções do fluxo de uma coluna ¹D são transferidas e reanalisadas em uma coluna ²D. GC×GC resulta em análises não direcionada, onde os compostos eluídos de uma coluna ¹D são continuamente reanalisados na coluna ²D, permitindo o perfil completo da amostra. É necessário um modulador para coletar frações da ¹D e passá-las "instantaneamente" para a coluna ²D. O emprego de um modulador criogênico estabelece uma zona de compressão entre as duas dimensões, resultando em um aumento na altura do pico (criofocagem). Isso contribui para aprimorar a resolução cromatográfica, permitindo uma utilização mais eficiente do espaço cromatográfico bidimensional^{97,116,118,119}.

Já a cromatografia gasosa bidimensional abrangente é uma técnica avançada que tem transformado significativamente a capacidade de separar e identificar componentes em amostras complexas. Foi originalmente proposta em 1991 por Phillips e Liu. Diferentemente da GC, a GC×GC utiliza duas colunas de separação independentes, proporcionando uma resolução excepcional e superando os desafios associados à coeluição em análises convencionais. Ela se fundamenta na hifenização de duas colunas capilares de GC, cada uma com uma seletividade diferente, conectadas por meio de um dispositivo de modulação, o modulador. Geralmente, a coluna da primeira dimensão (¹D) tem cerca de 30 metros de comprimento e um diâmetro interno (d.i.) de 0,25 a 0,32 mm, enquanto a coluna da segunda dimensão (²D) é mais curta para poder preservar o perfil de separação obtido na ¹D. Em um sistema GC×GC, a primeira coluna normalmente é apolar e a segunda é polar, embora a ordem inversa também seja possível. Essas colunas podem estar no mesmo forno ou em compartimentos diferentes, permitindo um maior controle de temperatura.

O modulador, considerado o "coração" da técnica, é acoplado entre as duas colunas. Sua função é amostrar e focalizar as pequenas frações eluídas da primeira coluna, liberando-as rapidamente para a segunda coluna. O período durante o qual ocorre a separação na coluna da segunda dimensão é denominado, período de modulação, e corresponde ao tempo de um ciclo completo de modulação. A figura 7 ilustra os princípios da GC×GC.

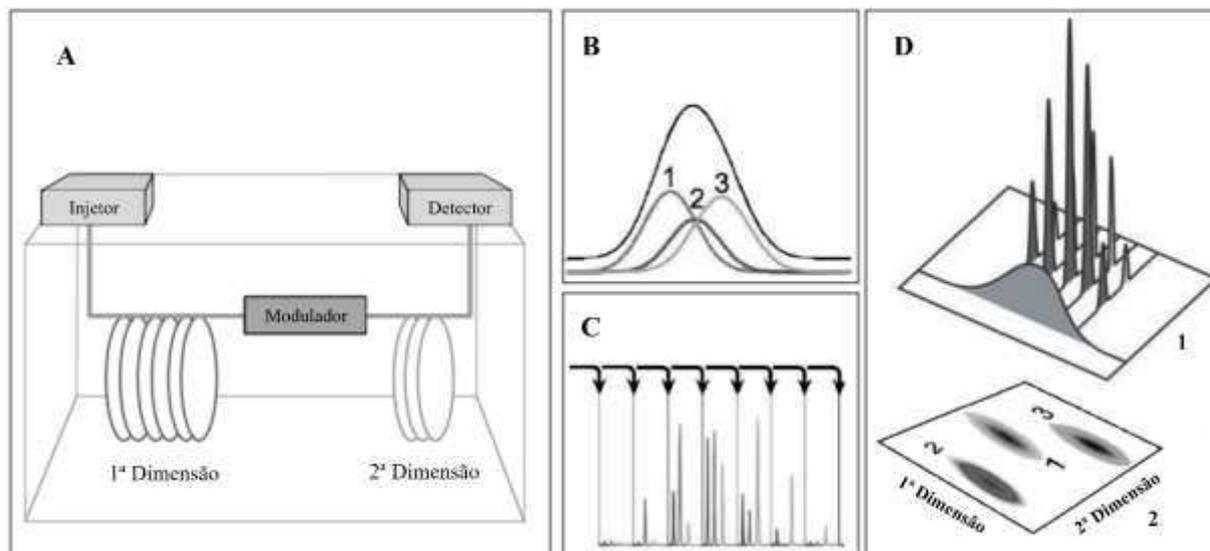


Figura 7: Instrumentação de GCxGC (A) e princípio de modulação (B, C e D). Adaptado da referência^{120,121}.

Na Figura 7B é mostrada uma banda cromatográfica larga, composta por analitos não separados na ¹D. Esses analitos são então eluídos na ²D e fracionados, conforme ilustrado na Figura 7C, resultando em um cromatograma bruto. Cada um dos cromatogramas individuais das frações pode ser isolado do cromatograma bruto, como ilustrado na Figura 7D1, e a partir deles podem ser gerados gráficos de sinal em função do tempo de retenção da primeira dimensão (¹tR) e do tempo de retenção da segunda dimensão (²tR), como mostrado no diagrama tridimensional da Figura 7D2. Esse diagrama tridimensional é representado por uma série de curvas de nível monocromáticas, conhecidas como diagrama de contorno (Contour Plot)^{120,121}.

Os picos gerados por um sistema GCxGC apresentam dois tempos de retenção, um na primeira dimensão (¹tR) e outro na segunda dimensão (²tR), proporcionando uma grande vantagem analítica ao referir-se a dois mecanismos de separação, facilitando a identificação de compostos. Isso permite a separação de solutos que co-eluem na primeira separação, desde que suas interações com a segunda fase estacionária sejam diferentes. Assim, uma série de separações muito rápidas na segunda dimensão é alcançada simultaneamente à separação na primeira dimensão¹²⁰⁻¹²⁵.

O sinal modulado bruto gravado pelo detector é então processado para visualização de cromatogramas ²D, onde os picos são exibidos como pontos em um plano de retenção, com o tempo de retenção da primeira dimensão no eixo x e o tempo de retenção da segunda dimensão no eixo y. A intensidade dos picos é indicada pela gradação de cores, e essa configuração pode ser vista como a cartografia de uma amostra. Além disso, uma reconstrução ³D pode ser obtida,

com o terceiro eixo (z) representando a intensidade do pico. A figura 8 ilustra uma visualização 3D de um cromatograma obtido por separações GC×GC-MS.

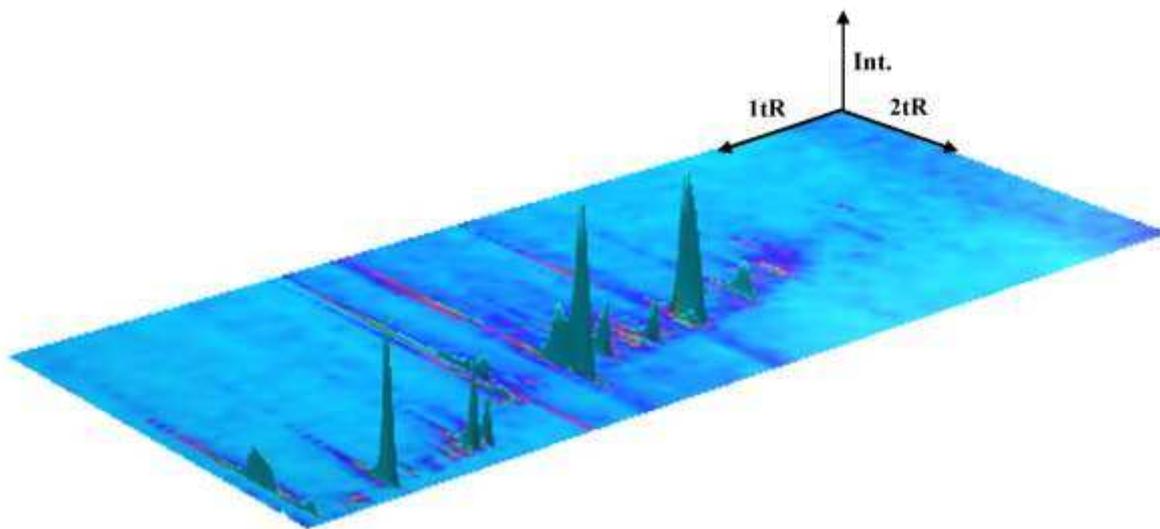


Figura 8: Visualização ³D obtida, com o terceiro eixo (z) representando a intensidade do pico de um cromatograma obtido por separações GC×GC-MS. (Próprio autor)

9.1 Moduladores

O modulador é o componente fundamental em GC × GC: ele deve coletar continuamente pequenas frações do eluato da ¹D, reconcentrá-las em uma banda estreita e injetá-las na ²D. Sua função principal é amostrar e focalizar as pequenas frações eluídas da primeira coluna, liberando-as rapidamente para a segunda coluna. Esse processo é essencial para evitar a sobrecarga da segunda dimensão com compostos indesejados e garantir uma separação eficaz.

Os moduladores podem ser categorizados em três tipos, cada um com seu princípio operacional distintivo. O primeiro tipo inclui dispositivos baseados em válvulas divisoras controladas eletrônica ou pneumaticamente, instaladas entre as colunas, que coletam frações do efluente da ¹D e as transferem para a ²D. Embora eficazes, esses moduladores têm como desvantagem a falta de reconcentração das frações. A segunda abordagem envolve a captura do eluato da ¹D em uma armadilha contendo um sorvente apropriado, seguida pela dessorção térmica para a ²D, como no caso do modulador original de Liu e Phillips. Uma versão aprimorada desse conceito é o modulador térmico de varredura, o primeiro disponível comercialmente para GC×GC, que utiliza um capilar de sílica com um filme interno espesso de fase estacionária. Este capilar, conectado entre as duas colunas, tem um aquecedor rotativo que dessorve e transporta continuamente os analitos para a 2D.

Por fim, a terceira forma de modulação é realizada por moduladores criogênicos, que são mais simples e robustos. Nestes, a coleta e reconcentração das frações do eluato da $1^{\circ}D$ são feitas por armadilhas criogênicas. Um exemplo é o sistema criogênico longitudinalmente modulado (LMCS), que utiliza resfriamento indireto por meio de uma camisa de refrigeração internamente refrigerada por CO_2 líquido. Essa camisa se move sobre um trilho no forno do cromatógrafo, resfriando seletivamente setores da $2^{\circ}D$ para concentrar os analitos. Embora represente uma inovação importante, o LMCS ainda tem algumas limitações, especialmente para analitos extremamente voláteis, devido à insuficiência de resfriamento para reter essas substâncias^{120,121,123,126}.

Outros moduladores criogênicos que estão cada vez mais utilizados são baseados em jatos frios estão sendo cada vez mais empregados. Nestes moduladores, o resfriamento é feito através de jatos de CO_2 ou de N_2 líquidos diretamente lançados sobre a coluna. Válvulas instaladas fora do forno são abertas e fechadas sincronizadamente, criando ciclos de modulação através do resfriamento alternado de seções da $2^{\circ}D$. As principais vantagens destes moduladores em comparação com o LMCS são sua robustez (eles não têm partes móveis) e a alta eficiência de resfriamento.

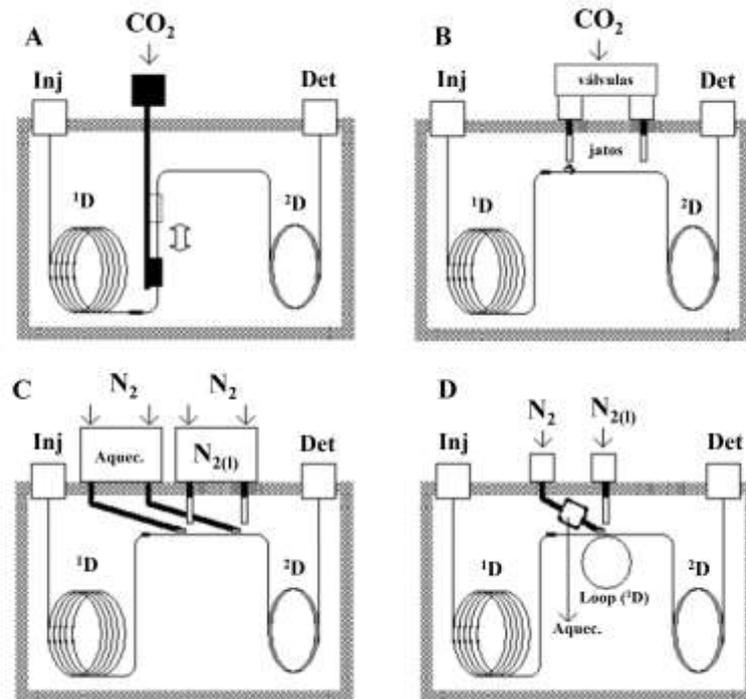


Figura 9: Diagramas de moduladores criogênicos. (A) LMCS, (B) modulador criogênico de duplo jato, (C) modulador com dois jatos quentes e dois jatos frios, (D) modulador com um jato quente e um jato frio. "Inj." refere-se ao Injetor, "Det." ao Detector, e "aquec." ao aquecimento. Adaptado da referência¹²¹.

Dentre os moduladores criogênicos de jatos destacam-se o de duplo jato frio (Figura 9B), que utiliza CO₂ como fluido criogênico, o de duplo jato frio e duplo jato quente (Figura 9C) e o com um jato frio e um quente (*loop modulator*, Figura 6D)¹²¹. O fluido criogênico desses dois últimos moduladores é o nitrogênio líquido, resultando na coleta efetiva até mesmo para analitos altamente voláteis^{120,121,126}.

O processo de modulação faz com que as bandas cromatográficas em sistemas GC×GC sejam 10 a 50 vezes mais estreitas que em GC, resultando em picos modulados com largura de base entre 50 e 500 ms, exigindo detectores com resposta rápida e com pequenos volumes internos. Além de compatibilidade com bandas cromatográficas estreitas, os sistemas eletrônicos e de processamento de dados associados à detecção também devem possibilitar taxas de coleta (número de leituras do sinal digitalizado do detector por segundo) compatíveis: 100 Hz ou mais, o que implica em arquivos de dados extremamente extensos^{120,121,126}.

9.2 Detector

Em GC×GC, a utilização de uma detecção seletiva desempenha um papel crucial na análise de amostras com uma ampla diversidade em sua composição, especialmente quando combinada com espectrometria de massas (MS), tornando-se uma ferramenta poderosa para a análise dessas misturas complexas. As bandas cromatográficas refletem larguras de pico da ordem de 100 ms ou menos, o que requer uma alta velocidade de aquisição de dados. Essa velocidade de aquisição de dados depende do processo físico-químico envolvido na detecção e dos sistemas eletrônicos de conversão de sinal, que devem ser compatíveis com as exigências do sistema GC×GC^{120,121}.

Embora QMS não seja a configuração mais adequada quando comparado ao TOFMS para GC×GC, a aplicabilidade da GC×GC-QMS tem sido investigada devido à disponibilidade de GC/qMS nos laboratórios de pesquisa e à possibilidade de transformá-lo em um GC×GC pela instalação de um kit comercial (ou desenvolvimento do mesmo)¹²⁷⁻¹³⁰. GC×GC-QMS frequentemente consegue resolver analitos que não foram separados pela GC-MS convencional devido à alta resolução proporcionada pelo GC×GC, reduzindo significativamente a coeluição. No entanto, o GC×GC-QMS requer uma taxa de amostragem do QMS de pelo menos 25 Hz para ser conduzido com alta resolução do GC×GC^{127,129-133}.

Como GC×GC-QMS é robusto, tem custo menor e de fácil operação, muitos estudos foram realizados para melhorar essa hifenação, incluindo a diminuição da faixa de massa a ser investigada na análise para aumentar a taxa de aquisição do QMS e o desenvolvimento de um

sistema de quadrupolo rápido, que permite uma taxa de aquisição maior que 50 Hz. Os espectros obtidos por GC×GC-QMS são mais "limpos" do que os obtidos por GC-QMS devido à separação na segunda coluna, que permite que o analito seja separado de outros interferentes, e à diminuição do ruído no sistema GC×GC^{121,123,128-130,133}.

Além do controle das condições instrumentais e dos parâmetros de separação e detecção em cromatografia gasosa bidimensional abrangente, geralmente são empregadas técnicas de preparo de amostra. Dentro deste cenário, a combinação HS-SPME-GC×GC-MS tem sido considerada uma alternativa poderosa para a análise de compostos voláteis que descrevem o perfil de VOC em amostras multicomponentes em matrizes complexas. Porém a complexidade inerente dos dados obtidos utilizando o método HS-SPME-GC×GC-MS apresenta desafios na análise dos dados gerados¹³⁴. Os dados de GC×GC-MS podem ser utilizados para abordar uma variedade de objetivos no contexto do projeto experimental. Por exemplo, é possível caracterizar as amostras com base nas medições químicas, além de identificar os principais compostos indicativos de um estímulo particular de causa e efeito (como os obtidos por meio da análise sensorial) e relacionar as medições químicas a essas outras propriedades medidas das amostras¹³⁵.

10. HS-SPME-GC×GC-QMS para análises de alimentos

Aroma, sabor e sensação na boca são elementos cruciais que compõem o sabor dos alimentos, sendo o aroma particularmente determinante na escolha, percepção e aceitação dos consumidores. Representando cerca de oitenta por cento do prazer alimentar, os compostos voláteis, como fonte do aroma alimentar, desempenham um papel vital na avaliação e melhoria da qualidade sensorial dos alimentos, bem como na identificação e classificação dos produtos. Os compostos voláteis, são uma fonte crucial de informações que podem auxiliar, orientando processos de produção, processamento e utilização de matérias-primas. Além disso, permitem investigar as diferentes espécies de compostos, suas quantidades e os métodos pelos quais são formados nos alimentos¹³⁶⁻¹³⁸

Atualmente, a cromatografia gasosa bidimensional abrangente desponta como uma técnica promissora para uma análise mais minuciosa e abrangente, permitindo a identificação de uma ampla gama de componentes em alimentos. Ao combinar duas colunas cromatográficas com diferentes fases estacionárias, e uso de um detecto seletivo como QMS o GC×GC-QMS oferece alta resolução e sensibilidade na separação e identificação de compostos voláteis em

alimentos. A Microextração em fase sólida por *headspace* complementa essa abordagem ao permitir a extração seletiva de compostos voláteis, essenciais na análise de alimentos, onde muitos dos compostos de interesse estão na forma volátil. Ao capturar os compostos presentes no *headspace*, a HS-SPME simplifica a preparação da amostra, eliminando a necessidade de tratamentos complexos, além de oferecer sensibilidade e seletividade aprimoradas, permitindo a detecção de compostos em concentrações muito baixas^{131,136-139}

Quando combinadas as técnicas HS-SPME, GC×GC e espectrometria de massas por quadrupolo (QMS), essa abordagem oferece uma maneira altamente eficaz de analisar alimentos, possibilitando a identificação e quantificação precisa de uma variedade de compostos. Essa integração contribui para garantir a segurança e a qualidade dos alimentos no mercado, representando uma abordagem completa e sensível para a análise de compostos voláteis em alimentos, fornecendo informações valiosas tanto para a indústria alimentícia quanto para os consumidores¹³⁸.

As informações obtidas através da análise por HS-SPME-GC×GC-QMS podem ser divididas em dois grupos principais: não direcionadas e direcionadas. Esses dados servem a uma variedade de propósitos, incluindo a obtenção de perfis qualitativos, a confirmação da autenticidade dos alimentos, a avaliação da qualidade e segurança (por exemplo, detecção de produtos de degradação, pesticidas etc.), a conformidade com regulamentos específicos de produtos alimentares (como indicações geográficas protegidas, denominação de origem etc.)^{136,137}.

Os experimentos não direcionados podem ser classificados em duas categorias: perfil qualitativo geral e impressão digital. Enquanto o perfil qualitativo geralmente envolve a análise de apenas uma ou algumas amostras, a impressão digital é voltada para a análise de muitas amostras para identificar marcadores únicos, que são então explorados para diferenciar características como origem geográfica, grau de torrefação, entre outros. Tais estudos muitas vezes exigem o uso de métodos quimiométricos e/ou software especializado. E as análises direcionadas são realizadas análises específicas para determinar transformações intencionais ou naturais de soluto como análise relacionada à contaminação por pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, entre outros^{131,136,137,139}.

Nas análises de bebidas, especialmente as bebidas alcoólicas fermentadas, as análises não direcionadas são de destaque, com um foco principal na compreensão da composição do aroma, fundamental para aprimorar as propriedades sensoriais. O aroma, que desempenha um papel

crucial na escolha do consumidor, tem sua origem principalmente nos ingredientes, mas também sofre uma forte influência do processo de produção. Quando se trata de investigar o aroma e os aspectos sensoriais de bebidas, a amostragem *headspace* é indiscutivelmente a técnica mais primária e amplamente empregada, especialmente quando combinada com SPME e GC × GC-QMS^{127,131,132,138}.

Para obter informações detalhadas e abordar questões complexas relacionadas à qualidade e autenticidade das bebidas alcoólicas fermentadas, o uso do SPME-GC × GC-MS tornou-se indispensável para a análise abrangente de analitos voláteis e semivoláteis. A maioria dos estudos revisados sobre bebidas alcoólicas fermentadas empregou o SPME no modo HS para a análise do aroma^{52,55,82–93,131,140–143}. A técnica de HS-SPME, combinada com GC×GC-QMS, tem sido utilizada para distinguir cervejas com duas cepas de levedura diferentes^{143–145}. Também tem aplicação em análises de descrição do perfil volátil por adição de adjuntos não convencionais^{4,25,29,51,52,85,90,142,146–152}.

Em resumo, a combinação de microextração em fase sólida por *headspace*, cromatografia gasosa bidimensional abrangente e espectrometria de massas quadrupolo oferece uma abordagem altamente eficaz e sensível para a análise de alimentos. Essa técnica permite a identificação e quantificação precisa de uma ampla variedade de compostos, contribuindo para a garantia da segurança e qualidade dos alimentos disponíveis no mercado.

10.1 Otimização HS-SPME-GC×GC-QMS

O processo de otimização busca aprimorar o desempenho de um procedimento, processo ou produto para maximizar seus benefícios. Na química analítica, otimizar um procedimento implica identificar as condições que resultam na melhor resposta possível. Uma técnica multivariada significativa usada para essa finalidade é a metodologia de superfície de resposta (RSM). Nesse contexto, é crucial ter uma compreensão básica de quais variáveis e como elas influenciam o sistema^{153–156}. Como na HS-SPME, as variáveis que afetam o sistema já são conhecidas, incluindo tempo e temperatura de extração, tipo de fibra, concentração salina, volume de amostra, agitação, entre outros, é possível utilizar métodos de RSM, sem precisar da etapa de triagem^{92,157–166}. O objetivo é selecionar dentre as variáveis já conhecidas previamente, as que exercem os maiores efeitos sobre as respostas e otimizar simultaneamente os níveis dessas variáveis para alcançar o melhor desempenho do sistema. Dado que inúmeras variáveis podem afetar a resposta do sistema estudado, a RSM permite uma análise sistemática e eficaz para determinar as condições ideais de operação^{154–156,167,168}.

O planejamento Doehlert é um projeto experimental voltado para modelos de ordem superior e representa uma alternativa prática e econômica em comparação com outras matrizes experimentais de segunda ordem. Apesar de algumas desvantagens, sua grande aplicabilidade na metodologia de superfície de resposta (RSM) se deve à necessidade de poucos pontos experimentais e à capacidade de aplicação de cada variável em diferentes números de níveis, o que mantém uma alta eficiência.^{154,156,168} Na HS-SPME, as variáveis que afetam o sistema são bem conhecidas no campo da química analítica, e compreende-se como elas podem influenciar a eficiência da extração. Portanto, essas variáveis são otimizadas, uma vez que a HS-SPME é uma técnica dependente das propriedades físico-químicas da matriz da amostra. Assim, essas variáveis devem ser avaliadas para obter uma superfície de resposta ótima para a extração dos analitos de interesse na matriz em estudo^{169,170}. Dessa forma, o Planejamento Doehlert pode ser aplicado às variáveis que influenciam a HS-SPME em cada sistema estudado.

Para otimizar a configuração do GC×GC-QMS, é necessário ajustar diversos parâmetros relacionados à configuração do GC, como a programação de temperatura, o fluxo na coluna e a temperatura e o modo de injeção do injetor. A temperatura de programação é limitada pela temperatura máxima suportada pela coluna em uso. Ao adicionar uma segunda dimensão com um diâmetro interno menor, é essencial ajustar o fluxo na coluna para garantir um fluxo ideal ao longo de todo o processo cromatográfico, levando em consideração a configuração do conjunto de colunas utilizado. A temperatura do injetor é limitada pelo método de dessorção empregado; por exemplo, para fibras, é preferível usar temperaturas mais baixas do que as suportadas por elas. O método de injeção também deve ser considerado, sendo possível escolher entre *split* ou *splitless*, dependendo da análise desejada. No caso da análise de aromas, o método ADAMS¹⁵³ é preferível sendo necessário apenas o ajuste da pressão no conjunto de colunas. Os parâmetros relacionados à modulação, como a pressão do jato quente, a temperatura do segundo forno e do jato quente, e o período de modulação, requerem atenção especial. Esses parâmetros devem ser otimizados para cada matriz de amostra analisada pelo sistema GC×GC e podem ser otimizá-los individualmente^{64,103,104,106,108,110,171}.

Aprimorar a técnica de GC×GC-MS e HS-SPME é essencial para assegurar resultados confiáveis e de alta qualidade na química analítica. Técnicas como RSM e Planejamento Doehlert desempenham um papel crucial nesse processo. Estudos de otimização possibilitam ajustar o sistema de acordo com as exigências específicas da análise, garantindo uma separação eficiente e uma detecção precisa dos analitos.

10.2 Estrutura dos dados

A análise por cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas (GC×GC-MS) é uma técnica poderosa amplamente empregada na análise de compostos em amostras com composição diversificada. Nesse contexto, a estrutura dos dados desempenha um papel fundamental na interpretação e na extração de informações significativas^{172,173}.

Em GC×GC-MS, os dados são gerados a partir da detecção de íons resultantes da ionização dos compostos presentes na amostra após a separação cromatográfica. A primeira dimensão (ou cromatografia) separa os compostos com base em suas propriedades físico-químicas, como ponto de ebulição, polaridade e massa molecular. Em seguida, os eluentes são introduzidos na segunda dimensão, que proporciona uma separação adicional com base em características complementares, como afinidade de polaridade, volatilidade e estrutura química^{174,175}. A estrutura dos dados em GC×GC-MS é tridimensional, composta pelo tempo de retenção ao longo das duas dimensões cromatográficas e a intensidade de sinal correspondente à resposta do detector de massa para cada íon detectado. Essa complexa estrutura de dados resulta em um volume considerável de informações, tornando essencial a aplicação de técnicas adequadas de processamento e análise.¹⁷⁶ A interpretação desses dados pode ser realizada por meio de softwares especializados, que permitem a visualização e análise das eluições cromatográficas em três dimensões. Além disso, a recuperação de informações bioquímicas relevantes requer o uso de ferramentas estatísticas poderosas para lidar eficazmente com a enorme quantidade de dados gerados por GC×GC-MS^{156,168,177}.

Antes que muitos dos métodos de análise quimiométrica possam ser aplicados, é necessário realizar um pré-processamento nos dados. Esses procedimentos visam remover ou minimizar artefatos nos dados, como ruído, efeitos de linha de base e mudanças de tempo de retenção^{138,139}. Isso é feito para garantir que as análises quimiométrica sejam significativas e capazes de extrair informações originais dos dados brutos. Etapas comuns de pré-processamento incluem redução de ruído, correção de linha de base, normalização e alinhamento de tempo. Essas etapas são especialmente cruciais para identificar compostos de baixa abundância ou para distinguir picos sobrepostos.¹³⁵ Essas etapas são especialmente cruciais para identificar compostos de baixa abundância ou para distinguir picos sobrepostos.

11. ANÁLISE MULTIVARIADA DOS DADOS

A análise multivariada de dados é uma poderosa abordagem estatística que explora relações complexas entre múltiplas variáveis em um conjunto de dados. Enquanto os métodos univariados se concentram em uma variável por vez, a análise multivariada considera simultaneamente várias variáveis, revelando padrões e estruturas ocultas que poderiam passar despercebidos de outra forma. Essa perspectiva é essencial, uma vez que muitos fenômenos do mundo real são influenciados por múltiplos fatores, exigindo uma análise abrangente para uma compreensão completa do sistema em questão^{175,178,179}.

A gama de técnicas estatísticas abrangidas pela análise multivariada é vasta, incluindo métodos como a Análise de Componentes Principais (PCA) e a Análise Discriminante pelo método de quadrados mínimos parciais (PLS-DA). Essas ferramentas são fundamentais para entender as relações entre variáveis independentes e dependentes, identificar padrões em conjuntos de dados complexos e reduzir a dimensionalidade dos dados enquanto se preserva o máximo de informação possível^{156,179}.

A PCA, em particular, destaca-se como uma técnica amplamente utilizada para redução de dimensionalidade, simplificando conjuntos de dados complexos sem perder sua essência informativa. Isso é especialmente útil em cenários onde lidamos com múltiplas variáveis, cujos padrões subjacentes podem ser difíceis de visualizar e interpretar^{138,179,180}.

Já o PLS-DA é empregado com frequência na identificação das variáveis mais relevantes para distinguir entre grupos conhecidos, sendo valioso em problemas de classificação nos quais é necessário atribuir corretamente novas observações a grupos pré-determinados com base em suas características¹⁷⁹.

A análise multivariada de dados desempenha um papel fundamental em diversas áreas, desde as ciências sociais até a biologia, economia e ciência da computação. Permitindo a exploração de relações complexas e a extração de insights significativos de conjuntos de dados multifacetados, seu uso adequado possibilita uma compreensão mais profunda dos fenômenos estudados e embasa tomadas de decisão mais informadas e fundamentadas.

11.1 Pré-processamento

O pré-processamento de dados desempenha um papel crucial em diversas análises científicas, incluindo aquelas conduzidas na cromatografia gasosa bidimensional abrangente acoplada à espectrometria de massas (GC×GC-MS). A utilização dos cromatogramas brutos requer essa etapa para adequar os dados à análise estatística¹⁸¹. A escolha do método de pré-

processamento não depende apenas das informações químicas desejadas, mas também do método de análise de dados selecionado, pois diferentes abordagens se concentram em aspectos distintos dos dados. Essa etapa visa preparar os dados brutos gerados pelo equipamento antes do processamento quimiométrico, removendo artefatos e ajustando as características dos dados para garantir uma interpretação precisa e significativa¹⁸¹⁻¹⁸³.

Existem diversas estratégias de pré-processamento de dados, incluindo a redução de ruído, correção de linha de base, normalização, remoção de artefatos, média centrada, alinhamento de tempo, entre outras. O ruído nos dados pode mascarar os sinais dos compostos de interesse, portanto, é fundamental aplicar técnicas de redução de ruído para filtrar ou suavizar os dados, preservando os sinais relevantes. Por sua vez, a presença de uma linha de base irregular pode distorcer os sinais dos picos de interesse, exigindo a correção de linha de base para remover ou corrigir essas irregularidades e assegurar uma representação precisa dos picos^{179,182-184}.

A normalização é empregada para ajustar a escala dos dados, garantindo que diferentes amostras tenham a mesma amplitude e facilitando a comparação entre elas. Já a média centrada é utilizada para remover a variabilidade associada a um deslocamento geral, subtraindo a média do cromatograma de cada sinal. Durante a análise, podem surgir artefatos de diversas fontes, como oscilações no sinal do detector. Esses artefatos devem ser identificados e removidos dos dados para evitar interpretações incorretas^{179,185}.

O alinhamento de tempo é uma técnica essencial para corrigir variações decorrentes de diferenças nas condições de execução da análise, garantindo que os picos correspondentes de diferentes amostras sejam comparáveis. Assim, essas estratégias de pré-processamento desempenham um papel crucial na preparação dos dados para análise quimiométrica, contribuindo para a obtenção de resultados mais confiáveis e significativos^{179,184}.

Conforme mencionado anteriormente, o método de alinhamento é desenvolvido com o propósito de eliminar deslocamentos no tempo de retenção dos sinais brutos, sendo utilizado como um passo de pré-processamento dos dados para reduzir variações quimicamente irrelevantes. Isso é feito com o objetivo de aprimorar a precisão e a exatidão das análises qualitativas e quantitativas. Nas aplicações cromatográficas, é fundamental que o tempo de retenção para um mesmo composto seja consistente entre as amostras. A variação no tempo de retenção para um mesmo composto em diferentes amostras compromete a interpretação química

dos componentes, bem como a capacidade preditiva dos modelos de regressão e classificação^{179,181,184}.

Para evitar esse problema, foram desenvolvidos algoritmos que permitem o alinhamento de cromatogramas inteiros, os quais são amplamente empregados. A escolha de um algoritmo é guiada principalmente pela complexidade do sinal a ser processado, como o número de coeluições, a variabilidade na abundância de picos e a importância dada ao tempo de cálculo, além da qualidade de alinhamento desejada e do grau de preservação das formas dos picos. Assim, a natureza do sinal exerce uma forte influência na seleção do método de processamento. Conseqüentemente, o pré-processamento de dados GC×GC deve incluir algoritmos de alinhamento de pico, como o *icoshift* (*Interval Correlation Optimized Shifting*) e o COW (*correlation optimized warping*), para serem aplicados aos dados antes de sua utilização¹⁷⁹.

Em GC×GC, as bandas cromatográficas transferidas para a segunda coluna são frações estreitas da primeira dimensão, geralmente variando de 10 a 150 milissegundos. Nesse contexto, o algoritmo *icoshift*, inicialmente desenvolvido para dados de RMN, pode oferecer excelentes resultados em GC×GC-MS. O *icoshift* é especialmente adequado para cromatografia bidimensional abrangente devido à sua rapidez, capacidade de preservar a forma dos picos e desempenho eficaz em alvos com formas irregulares. Uma característica importante do algoritmo é a necessidade de definir os intervalos sempre na linha de base, evitando assim a introdução de artefatos nos cromatogramas^{179,181,184}.

As etapas de pré-processamento são fundamentais para assegurar a qualidade e confiabilidade dos resultados em GC×GC-MS. Preparando os dados adequadamente, os pesquisadores podem extrair informações valiosas sobre a composição das amostras, identificar compostos de interesse e realizar análises estatísticas significativas usando ferramentas quimiométricas. O emprego de ferramentas quimiométricas no tratamento dos dados permite a extração de informações químicas relevantes das amostras. Esses métodos visam analisar os dados qualitativamente, reduzindo o tempo de processamento e aumentando a capacidade de identificar diferenças entre as amostras, correlacionando-as com as propriedades medidas^{175,177,179}.

Frequentemente, os métodos quimiométricos são utilizados para extrair características distintivas de classes úteis de compostos, podendo ser aplicados em métodos supervisionados ou não, dependendo do conhecimento prévio sobre a associação das amostras. Essa abordagem

permite uma análise completa e detalhada dos dados, contribuindo para uma compreensão mais abrangente da composição e das propriedades das amostras analisadas.

11.2 Métodos de análise exploratória dos dados

A análise exploratória de dados desempenha um papel crucial na compreensão da estrutura e das características intrínsecas dos conjuntos de dados, fornecendo insights valiosos sobre padrões, tendências e anomalias. Por meio de métodos estatísticos e técnicas visuais, como histogramas, gráficos de dispersão e análise de correlação, essa abordagem permite identificar relações entre variáveis, detectar outliers e examinar a distribuição dos dados. Além disso, técnicas avançadas de redução de dimensionalidade, como Análise de Componentes Principais (PCA) e Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), são frequentemente empregadas para explorar padrões complexos nos dados. O PCA, por exemplo, busca transformar variáveis correlacionadas em componentes principais não correlacionados, enquanto o HCA agrupa observações com base em medidas de proximidade ou dissimilaridade^{186,187}.

Essas técnicas não supervisionadas de reconhecimento de padrões oferecem uma visão aprofundada dos dados, revelando estruturas subjacentes e facilitando a interpretação dos resultados. A integração dessas ferramentas na análise exploratória amplia a compreensão dos dados, permitindo uma exploração mais completa e uma tomada de decisão mais informada¹⁸⁷.

O PCA é amplamente utilizado em análises de perfil cromatográfico devido à sua eficácia em distinguir dados semelhantes e revelar padrões ocultos^{74,174,177,179,182,183,186,187}. Funciona encontrando as direções de máxima variação nos dados e projetando os dados nessas direções, chamadas de componentes principais (PC). O primeiro PC captura a maior variação, e os subsequentes capturam a variação restante, sendo ortogonais entre si. Esses PC permitem visualizar os dados em um espaço de menor dimensão, facilitando a identificação de padrões. No entanto, pressupõe que os dados sejam linearmente correlacionados, podendo ser desafiador interpretar os PC, que são combinações lineares de múltiplas variáveis. A projeção (scores) dessas medições nos planos PC1/PC2 facilita a identificação de padrões e clusters, enquanto os loadings representam a correlação entre PC e variáveis, ajudando na interpretação dos resultados¹⁸⁶.

11.3 Métodos Supervisionados de reconhecimento de padrões

Os métodos supervisionados de reconhecimento de padrões, também conhecidos como métodos de classificação, representam técnicas analíticas que utilizam informações prévias sobre as amostras para orientar a análise e interpretação dos dados. Ao contrário dos métodos não

supervisionados, onde as classes ou categorias das amostras não são conhecidas previamente, nos métodos supervisionados, a classe ou categoria a que cada amostra pertence é conhecida. Isso permite que o modelo estatístico seja treinado para reconhecer padrões específicos relacionados a essas classes.

Os métodos supervisionados baseiam-se na disponibilidade de um conjunto de dados de treinamento, no qual cada amostra está previamente classificada em uma ou mais classes conhecidas. O modelo estatístico é então treinado com esses dados para aprender os padrões discriminatórios que distinguem as diferentes classes. Uma vez treinado, o modelo pode ser aplicado a novas amostras para prever ou classificar sua classe com base nos padrões aprendidos durante o treinamento.

Dentre os métodos supervisionados, *Partial Least Squares Discriminant Analysis* (PLS-DA) é amplamente empregado em análises de classificação em diversas áreas ômicas. Esta técnica utiliza informações de classe para otimizar a separação entre as classes no espaço de características, permitindo uma classificação eficiente de novas amostras. PLS-DA teoricamente combina redução de dimensionalidade e análise discriminante em um único algoritmo, sendo especialmente adequado para modelar conjuntos de dados de alta dimensão, como aqueles obtidos por análises por GC×GC-MS/MS. Apesar de sua aparente simplicidade, PLS-DA tem sido amplamente adotado na solução de problemas de classificação em química analítica. Uma das principais vantagens do PLS-DA é sua capacidade de proporcionar uma representação visual do modelo de classificação dos dados. Ele explica os padrões e relacionamentos entre as classes e as amostras através dos scores das variáveis latentes (LV) e dos gráficos de loading. Durante a modelagem do PLS-DA, o vetor de classificação que registra o tipo de informação de cada amostra é transformado em uma matriz binária. Nessa matriz, o valor 1 indica que a amostra pertence à categoria especificada, enquanto o valor 0 indica que a amostra não pertence à classe especificada. O PLS então analisa essa matriz de dados e estima os valores correspondentes. É importante notar que os valores de classe estimados durante o processo de calibração raramente são exatamente iguais a 1 ou 0. Portanto, o critério do valor máximo é utilizado, onde valores próximos de 1 indicam que a amostra pertence à classe correspondente, enquanto valores próximos de 0 indicam o contrário.

Durante a análise, o PLS-DA utiliza algumas variáveis latentes (LVs), em vez de centenas de variáveis medidas. Essas LVs são construídas de forma a capturar a máxima covariância entre as variáveis independentes (tempos de retenção) e as variáveis dependentes (classe). Ao substituir as variáveis independentes originais por LVs, a dimensionalidade do

conjunto de dados é reduzida. Por exemplo, em vez de avaliar as amostras em termos de tempo de retenção em cada tempo de corrida, elas são avaliadas por sua "pontuação" em cada LV. Cada classe pode então ser descrita por um conjunto de pontuações que é típico para um membro dessa classe.

Conjuntos de dados "ômicos" típicos contêm de grande número de amostras e frequentemente mais de 10.000 variáveis. A vantagem de utilizar quimiometria nesses grandes conjuntos de dados está na sua capacidade de lidar eficientemente com conjuntos de dados colineares que possuem muito mais variáveis do que amostras. No entanto, a tendência contínua de registrar um número crescente de variáveis a partir dos instrumentos analíticos modernos está levando as ferramentas quimiométricas aos seus limites, aumentando também as chances de correlações, artefatos e interferências espúrias.

Uma limitação encontrada em análises convencionais por PLS-DA é a tendência de registrar cada vez mais variáveis, o que sobrecarrega as ferramentas quimiométricas e aumenta o risco de correlações, artefatos e interferências. Como alternativa, uma nova abordagem baseada na decomposição sistemática do espaço de variáveis em intervalos vem sendo utilizada para melhorar o desempenho dos modelos quimiométricos, reduzindo interferências.

O modelo de mínimos quadrados parciais de análise discriminante intervalar, iPLS-DA, surgiu como uma ferramenta poderosa para auxiliar na interpretação. Esta técnica tem sido utilizada principalmente para seleção de variáveis (região) e é adequada também para interpretação de resultados. No iPLS-DA, as regiões de picos nos cromatogramas são divididas em intervalos, que podem ser uma única variável ou uma janela de variáveis adjacentes. Cada intervalo é usado para treinar um novo PLS-DA, cujos resultados são utilizados para avaliar a informatividade do intervalo para a modelagem, fornecendo informações diretas sobre a correlação dos intervalos do cromatograma em relação à variável dependente. No caso de classificação/discriminação, isso é expresso pelo número de classificações incorretas, onde a ausência de classificações incorretas indica um alto desempenho na previsão de classe.

OBJETIVO GERAL

Explorar e investigar os procedimentos de extração, separação e detecção dos compostos voláteis gerados por HS-SPME-GC×GC-QMS, otimizados através de planejamento Doehlert, com o objetivo de obter as impressões digitais das amostras de cerveja. Demonstrar o uso de ferramentas de análise multivariada de dados para correlacionar propriedades sensoriais obtidas por ADQ com os resultados das análises dos compostos orgânicos voláteis por HS-SPME-GC×GC-QMS.

CAPÍTULO 2

**OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DE UM PROCEDIMENTO HS-
SPME+GC×GC-MS PARA DETERMINAR IMPRESSÕES DIGITAIS DA
FRAÇÃO VOLÁTIL DE CERVEJAS LAGER**

RESUMO

No Capítulo 2, descreve-se a otimização de um método HS-SPME-GC×GC-MS para a determinação de impressões digitais voláteis em cervejas lager. Esta otimização foi realizada por meio da aplicação de abordagens univariadas e multivariadas simultâneas. As amostras de teste consistiram em cervejas lager enlatadas da mesma marca utilizadas como padrão. Antes de sua utilização, as amostras foram submetidas a um procedimento de descarbonatação por congelamento e degelo, desenvolvido para minimizar a perda de compostos voláteis e efetivamente eliminar o CO₂. As condições de modulação criogênica no GC×GC foram otimizadas pela análise de cromatogramas, e para os parâmetros de extração, adotou-se uma abordagem multivariada utilizando uma matriz de Doehlert. A resposta as condições otimizada foi a área total integrada do pico. Os resultados da otimização multivariada indicaram que a eficiência da extração foi máxima com $V_{am} = 8,00$ mL, $T_{ext} = 40$ °C e $t_{extração} = 30$ min. Nas condições de extração otimizadas, foi possível identificar e detectar cerca de 240 a 270 picos cromatográficos na fração volátil das amostras. Foi observada a correspondência das regiões dos cromatogramas com a composição descrita nos rótulos fornecidos pelo fabricante. As análises de fingerprints das amostras, por meio da análise por PCA, proporcionaram insights sobre a autenticidade de sua composição, permitindo a distinção entre cervejas que continham milho e arroz, como indicado em seus rótulos, e aquelas que não especificavam qual cereal não maltado era utilizado. Esses resultados destacam que a integração de HS-SPME com GC×GC-MS pode ser uma ferramenta poderosa para obter informações qualitativas e quantitativas sobre a composição de cervejas.

Palavras-chave: Cerveja, otimização, fração volátil, HS-SPME-GC×GC-MS.

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida alcoólica obtida por processos fermentativos, e em sua produção são utilizados principalmente como ingredientes: malte, lúpulo, levedura e água. No entanto, em alguns casos, alguns adjuntos podem ser adicionados à cerveja para substituir e/ou complementar o grão de cevada, como arroz, milho e trigo. O sabor da cerveja é determinado pela matéria-prima, que está relacionada à qualidade, pela levedura utilizada, que classifica a cerveja em dois tipos: Ale e Lager, e pelas etapas de fermentação e maturação, com a produção de compostos que exercem a maior influência em suas características sensoriais ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰.

O crescente aumento da diversidade de estilos de cerveja demanda estudos que englobem o controle de qualidade desde a seleção da matéria-prima até a avaliação sensorial do produto. Uma abordagem eficaz para esse controle é a avaliação por meio do perfil de compostos voláteis. Essa metodologia se destaca ao ser aplicada em amostras com matrizes complexas, contendo açúcares, aminoácidos, proteínas, carboidratos e compostos orgânicos não voláteis, devido à simplificação dos procedimentos analíticos resultante. Para caracterizar adequadamente as impressões digitais voláteis, é imprescindível o uso de instrumentação analítica altamente sensível, capaz de identificar VOCs como ácidos, acetona, alcanos, álcoois, ésteres, fenóis e terpenos. Esses compostos fornecem informações cruciais para a caracterização da qualidade da cerveja e suas propriedades organolépticas ¹⁹¹.

A análise de VOC em cervejas demanda uma preparação inicial da amostra. Técnicas de extração do headspace são vantajosas por excluírem compostos não voláteis, como açúcares, que podem distorcer a caracterização e danificar equipamentos. A HS-SPME é uma técnica eficaz para essa análise, integrando amostragem, extração e pré-concentração em uma etapa única, sem o uso de solventes orgânicos prejudiciais. Comparada a métodos convencionais, a HS-SPME reflete com precisão a composição de componentes voláteis nas amostras ^{192,193}.

Atualmente, muitos estudos que investigam as impressões digitais de alimentos e bebidas optam pela análise de Compostos Orgânicos Voláteis utilizando a técnica de Microextração em Fase Sólida por HeadSpace (HS-SPME) e cromatografia gasosa unidimensional convencional ^{185,86,88,91,93,141,142,146,148,189,194-198}. No entanto, a GC×GC tem surgido como uma alternativa poderosa para caracterizar o perfil de voláteis em amostras alimentares, oferecendo maior resolução e sensibilidade ^{11,91,148,158,199,200}. A GC×GC permite a separação de diversos componentes voláteis e semivoláteis, sendo particularmente eficaz quando o objetivo é identificar o perfil de voláteis responsáveis pelo aroma e sabor das cervejas. Quando associada à

espectrometria de massa (GC×GC-MS), torna-se uma técnica extremamente poderosa na elucidação dessa matriz multicomponente ^{201–205}.

Este estudo visa aprimorar os procedimentos de HS-SPME-GC×GC-MS para identificar as impressões digitais de compostos voláteis característicos dos estilos de cervejas da família Lager, com o objetivo de associar a composição da fração volátil às informações de composição contidas nos rótulos, proporcionando uma compreensão mais precisa das características originais das cervejas. Nesta etapa, experimentos de design experimental multivariado foram selecionados para avaliar como as variáveis operacionais de HS-SPME influenciam a qualidade dos resultados. Neste trabalho, selecionamos o uso do planejamento experimental Doehlert para esta tarefa. Essa abordagem tem a vantagem de reduzir o número de experimentos necessários para otimizar os métodos de HS-SPME ^{169,206,207}.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Materiais

Foram utilizadas vinte e duas amostras de cervejas rotuladas pelos fabricantes como Lagers (as mais populares no Brasil) e comercialmente disponíveis no mercado local na otimização e validação do método otimizado. A **Tabela 1** apresenta informações sobre a composição declarada no rótulo das cervejas analisadas.

Tabela 1 :Identificação e qualificação das amostras de cerveja analisadas. (Continua)

#	Estilo ¹	Ingredientes ²
1	PILSEN	MLAL+ carboidratos
2	AMERICAN LAGER	MLAL + milho
3	PILSEN	MLAL
4	STANDART AMERICAN LAGER	MLAL + casca de laranja
5	PILSEN	MLAL + carboidratos
6	PILSEN	MLAL +mandioca
7	PREMIUM AMERICAN LAGER	MLAL+ carboidratos
8	LAGER	MLAL
9	PREMIUM AMERICAN LAGER	MLAL
10	PILSEN	MLAL + cereais não maltados
11	PILSEN	MLAL + carboidratos
12	AMERICAN LAGER	MLAL
13	LAGER	MLAL
14	PREMIUM AMERICAN LAGER	MLAL
15	PILSEN	MLAL

Tabela 1 :Identificação e qualificação das amostras de cerveja analisadas. (Conclusão)

#	Estilo ¹	Ingredientes ²
16	STANDART AMERICAN LAGER	MLAL + milho
17	LAGER	MLAL
18	PREMIUM AMERICAN LAGER	MLAL
19	PREMIUM AMERICAN LAGER	MLAL
20	LAGER	MLAL
21	AMERICAN LAGER	MLAL + milho
22	AMERICAN LAGER	MLAL+ arroz

Notas: 1. Estilo de cerveja conforme declarado pelo fabricante no rótulo; 2. MLAL: malte de cevada, lúpulo, água e levedura.

Para a técnica HS-SPME, foram empregados frascos de 22 mL com tampas e septos adequados, barras magnéticas lisas de 7×20 mm, e fibras SPME com revestimento de 65 µm de Polidimetilsiloxano / Divinilbenzeno (PDMS/DVB) e (Divinilbenzeno / Carboxeno / Polidimetilsiloxano) 30/50 µm PDMS/CAR/DVB (Supelco, Bellefonte, CT, EUA). A fim de promover o efeito *salting-out*, utilizou-se uma solução saturada de NaCl (LABSYNTH, Diadema-SP), preparada em água deionizada por meio de um dispositivo Milli-Q (Merck-Millipore, Darmstadt - Alemanha). Os índices de retenção com programação de temperatura linear (LTPRI) dos picos cromatográficos foram determinados por meio de cromatogramas de amostras selecionadas adicionadas com uma mistura de n-alcenos C8-C22 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As análises foram conduzidas em um sistema protótipo GC×GC-MS, utilizando o equipamento GCMS-TQ8030 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) com modulação de loop criogênico, concebido e montado no laboratório. A configuração da coluna compreendeu uma coluna Rxi-5Sil MS de 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm (Restek, Bellefonte, PA) como a primeira dimensão (¹D), conectada a uma segunda dimensão (²D) baseada em DBWAX de 1 m × 0,1 mm × 0,1 µm (Supelco, Bellefonte, CT, EUA) através de um inserte de união SilTite de volume zero FS (SGE Analytical, Ringwood, VC, Austrália). O loop de modulação entre ¹D e ²D consistiu em um segmento de 0,8 m da coluna ¹D.

2.2 Preparo das amostras de cerveja

Para realizar a descarbonatação, as cervejas foram submetidas a um congelamento instantâneo em nitrogênio líquido a -180°C. Esse procedimento tem como objetivo minimizar a perda de compostos voláteis das amostras. Após abrir a cerveja, ela foi imediatamente transferida para um recipiente de vidro já imerso em N_{2(l)}, permanecendo lá por 1 minuto. Posteriormente, os frascos contendo as amostras foram devidamente vedados e deixados para descongelar em ambiente refrigerado por aproximadamente 2 horas antes de serem submetidos à análise.

2.3 Otimização das Condições Operacionais do GC×GC-MS

2.3.1 Condições de modulação

As condições do método GC×GC-MS foram otimizadas utilizando extrações de uma amostra do conjunto de cerveja selecionada aleatoriamente. Para a modulação criogênica, as condições avaliadas durante a otimização foram: período de modulação (entre 4 e 6 s), tempos de injeção de jato frio (de 3 a 4,5 segundos) e jato quente (de 1 a 1,5 s) do modulador. A temperatura de aquecimento do bloco do modulador (200°C), a temperatura do jato quente (250°C) e a pressão do jato frio (10 psi) foram definidas após testes preliminares e mantidas fixas em todas as análises.

2.3.2 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas para a análise de Compostos Orgânicos Voláteis na cerveja foram modificadas com base em estudos anteriores^{189,195,208}. O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão constante de 1,2 mL/min. O programa de temperatura do forno iniciou a 40°C e foi aumentado a uma taxa de 3°C/min até atingir 200°C, e então aumentado para 250°C a uma taxa de 20°C/min. A temperatura foi mantida a 250°C por 2 minutos. A temperatura do injetor foi mantida a 230°C. O detector foi mantido a uma temperatura de 250°C tanto para a fonte de íons quanto para a linha de transferência. A aquisição de dados foi realizada a uma taxa de 25 Hz, no modo SCAN com uma faixa de varredura de razão massa-carga (m/z) de 40 a 500 m/z.

2.4 Procedimentos de Otimização para HS-SPME

Utilizou-se um planejamento experimental para determinar as condições ideais no processo de isolamento de compostos orgânicos voláteis que compõem o aroma e sabor de amostras de cerveja. O efeito de duas variáveis independentes na HS-SPME, nomeadamente temperatura e tempo de extração, foi otimizado e avaliado por meio da metodologia de superfície de resposta. Um total de 11 conjuntos de condições experimentais foram analisados para otimização do procedimento, com os experimentos organizados conforme uma matriz de Doehlert³⁶. Os dados para a elaboração dos testes e obtenção dos valores otimizados foram registrados em uma planilha elaborada para o uso de planejamento com duas variáveis. A Tabela 2 apresenta os parâmetros estudados, englobando o tempo de extração (15 a 30 minutos) e a temperatura de extração (25 a 40°C). Todas as análises foram conduzidas com um volume final de solução do sistema de 10 mL, adicionando 2 mL de solução salina saturada (m/v > 0,36%) e

8 mL da amostra de cerveja. A agitação constante a 1200 rpm foi mantida ao longo do processo. Essas variáveis foram selecionadas com base em relatos anteriores.^{189,190}

Duas fibras de diferentes fases de extratores (PDMS/DVB/CARB e PDMS/DVB) também foram investigadas. A comparação entre os dois tipos de revestimento de fibra foi feita com base na número total de pico detectados (eficiência de extração).

Tabela 2: Planejamento de Doehlert para a Otimização de HS-SPME.

Variável	Níveis das Variáveis				
Temperatura de extração (°C)	(-1,00) 25,0	(-0,50) 28,7	(0,00) 32,5	(0,50) 36,2	(1,00) 40,0
Tempo de extração (min)		(-0,866) 15,0	(0,00) 22,5	(0,866) 30,0	

2.5 Processamento e análise de dados

Os dados obtidos por GC×GC-MS foram processados por meio do software GCImage (Zoex, Houston, TX, EUA). O planejamento experimental Doehlert e a avaliação foram conduzidos utilizando ferramentas específicas implementadas na plataforma Matlab, na versão R2014a (The MathWorks, Inc., Natick, MA, EUA). A identificação dos compostos foi realizada com base na comparação dos espectros de fragmentação desconvoluídos dos compostos com as bibliotecas do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST)²⁰⁹ e similaridade, bem como pelo índice de retenção com programação linear de temperatura (LTPRI).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização do sistema GC×GC-MS Modulação

3.1.1 Modulação

O processo de modulação possibilita o isolamento de segmentos do eluente da primeira coluna e sua reinjeção na segunda coluna de forma contínua e sequencial ao longo da análise²⁰². Uma modulação adequada da amostra garante uma variabilidade significativa entre diferentes amostras, incluindo diferentes marcas de cerveja, com boa repetibilidade entre as amostras da mesma marca, eliminando o risco de subamostragem na separação unidimensional. Isso previne a perda de informações analíticas.²¹⁰. Neste estudo, utilizou-se a modulação criogênica, um

método altamente eficiente para transferir a fração de eluato da coluna ¹D para a coluna ²D durante o processo de modulação ²¹⁰.

O período de modulação é definido como o intervalo de tempo entre modulações, ou seja, a soma do tempo de coleta do eluente separado em ¹D (jato frio) com o tempo de reinjeção em ²D (jato quente). Este parâmetro exerce grande influência na largura dos picos e, consequentemente, na capacidade de resolução cromatográfica, sendo uma variável dependente da amostra em estudo. Os outros parâmetros que influenciam a modulação tiveram suas condições já determinadas em estudos anteriores e permaneceram fixos neste trabalho. Assim, o período de modulação foi otimizado especificamente para o estudo de amostras de cerveja, utilizando a largura dos picos como resposta. A Tabela 3 apresenta as condições otimizadas^{189,195}.

Tabela 3: Condições otimizadas para a modulação criogênica.

MODULAÇÃO	
Período	6 s
Jato quente	4.5 s
Jato frio	1.5 s

Para as amostras de cerveja em estudo, a modulação demonstrou um desempenho aprimorado na resolução cromatográfica com um período de modulação de 6 segundos, distribuído como 1,5 s para o jato quente e 4,5 s para o jato frio ²¹⁰. A Figura 10 ilustra a diferença entre os dois períodos de modulação (4 e 6 segundos). Como evidenciado na Figura 10B, os picos apresentaram menor largura e maior capacidade de pico quando utilizado um período de modulação de 6 s. Assim, esse período de modulação foi escolhido para análises subsequentes.

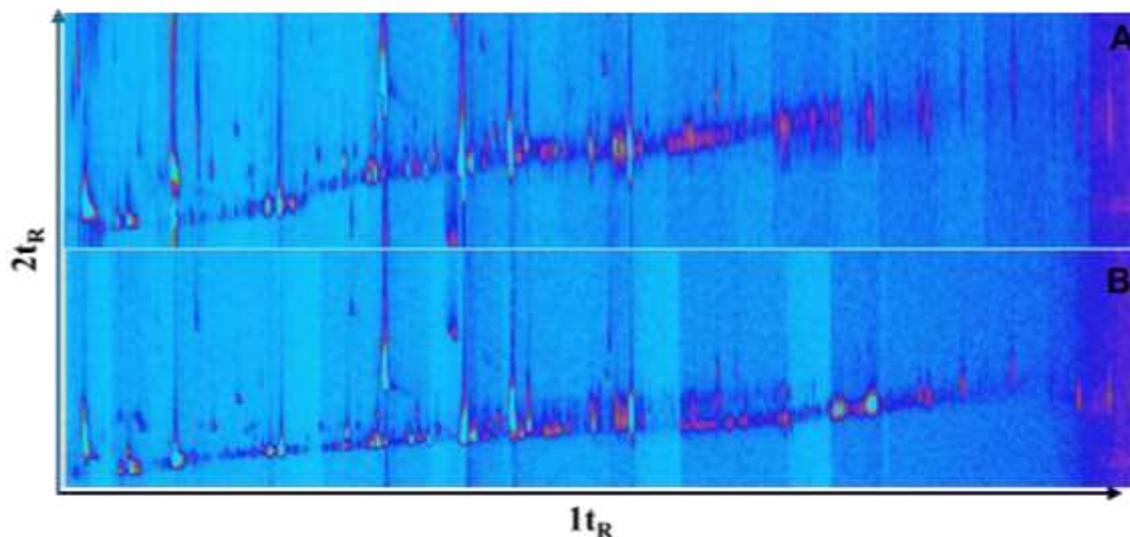


Figura 10: Cromatogramas GCxGC-MS obtidos durante a otimização do período de modulação para (A) 4s (3 s de jato frio e 1 s de jato quente) e (B) 6s (4,5 s de jato frio e 1,5 s de jato quente).

3.2 HS-SPME

No método de HS-SPME, diversas variáveis influenciam a eficiência da extração, incluindo a temperatura de extração, o tempo de extração, a velocidade de agitação, o tempo de equilíbrio, entre outras^{164,211-213}. Neste trabalho, optou-se por concentrar nos fatores esperados para terem um impacto significativo na eficiência de extração – tempo e temperatura de extração. escolha dos revestimentos das fibras de HS-SPME a serem estudadas foi fundamentada em estudos previamente documentados na literatura^{195,208}, que destacavam o uso frequente das fibras revestidas com PDMS/DVB/CAR e PDMS/DVB. Essas foram selecionadas para uma análise comparativa qualitativa através de extrações de uma mesma amostra cerveja . A **Figura 11** apresenta os cromatogramas obtidos.

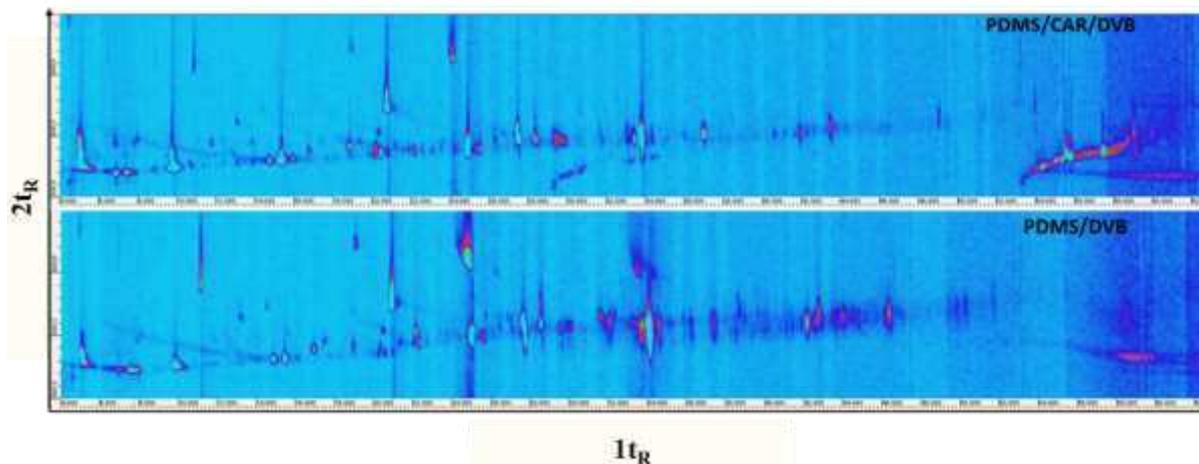


Figura 11: Cromatogramas bidimensionais obtidos a partir de duas fibras diferentes (DVB/CAR/PDMS, divinilbenzeno/carboxeno/polidimetilsiloxano; PDMS/DVB, polidimetilsiloxano/divinilbenzeno) utilizando a mesma amostra e nas mesmas condições: $V_{am} = 8$ mL, $T_{ext} = 50$ °C, $t_{extração} = 30$ min, agitação a 1200 rpm e 2 mL de solução salina saturada.

A soma total de picos detectados dos cromatogramas indica que a fibra PDMS/DVB apresentou maior eficiência na extração de analitos com maior retenção na coluna da 1ª dimensão, ou seja, com massas moleculares mais elevadas (na faixa de hidrocarbonetos de C_{10} a C_{16})^{73,214}. As fibras PDMS/DVB/CAR proporcionaram uma extração mais eficaz de espécies com baixa volatilidade e polaridade (retenções correspondentes aproximadamente ao alcano C_8). Compostos de maior massa molecular são os principais marcadores dos atributos sensoriais e descrevem melhor as diferenças entre as amostras de cerveja lager⁸⁷. Além disso, o etanol é um componente volátil importante nas cervejas e, devido à sua volatilidade, está presente em concentrações muito altas no espaço livre e provavelmente será adsorvido em grande quantidade nas fibras PDMS/DVB/CAR, juntamente com a água, o que é indesejável, pois resultaria na introdução de grandes quantidades de vapor no setor de ionização do MS. Portanto, as fibras PDMS/DVB foram selecionadas para os experimentos subsequentes.

Os parâmetros de tempo e temperatura de extração foram otimizados após a seleção da fibra, utilizando o planejamento experimental multivariado de Doehlert para obter condições que proporcionassem uma eficiência de extração mais elevada. A resposta otimizada foi definida como o número total de picos cromatográficos detectados para cada experimento; o limiar de detecção de pico foi ajustado em experimentos preliminares considerando os melhores valores para sinal/ruído. A Tabela 4 apresenta os valores das variáveis utilizadas em cada experimento e as respostas correspondentes (contagem de picos detectados).

Tabela 4: Níveis para variáveis otimizadas em cada experimento de otimização e respostas correspondentes (total de picos cromatográficos detectados).

#	T/ °C	t _{ext} /min	∑picos
1	32,50	22,50	281
2	40,00	22,50	268
3	28,75	30,00	285
4	25,00	22,50	215
5	28,75	15,00	230
6	36,25	15,00	235
7	28,75	30,00	253
8	32,50	22,50	281
9	32,50	22,50	287
10	32,50	22,50	293
11	32,50	22,50	326

Os resultados puderam ser adequadamente ajustados a uma superfície de resposta quadrática (**Figura 12**). A análise dos resultados mostrou que o modelo quadrático era estatisticamente significativo ($F=6,00$, $p<0,0272$). A qualidade do modelo foi confirmada pelo valor correspondente ao teste F (valor $p = 0,0272$), assim como o coeficiente de correlação para o modelo ($r^2 = 0,800$). Uma visão adicional sobre a validade do modelo pode ser obtida pela inspeção da **Figura 13**, que mostra um gráfico correlacionando os resíduos padronizados para cada valor do preditor utilizado para construir o modelo. Esta figura mostra que os resíduos do ajuste estão distribuídos aleatoriamente ao redor de zero e que não há valores atípicos, uma vez que todos os resíduos estavam dentro da faixa aceitável (-2 a +2) para validação do modelo.

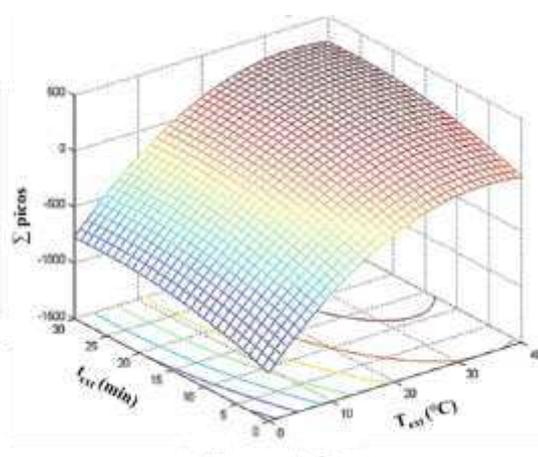


Figura 12: Diagrama da superfície de resposta mostrando os efeitos das variáveis significativas do HS-SPME-GC×GC-MS.

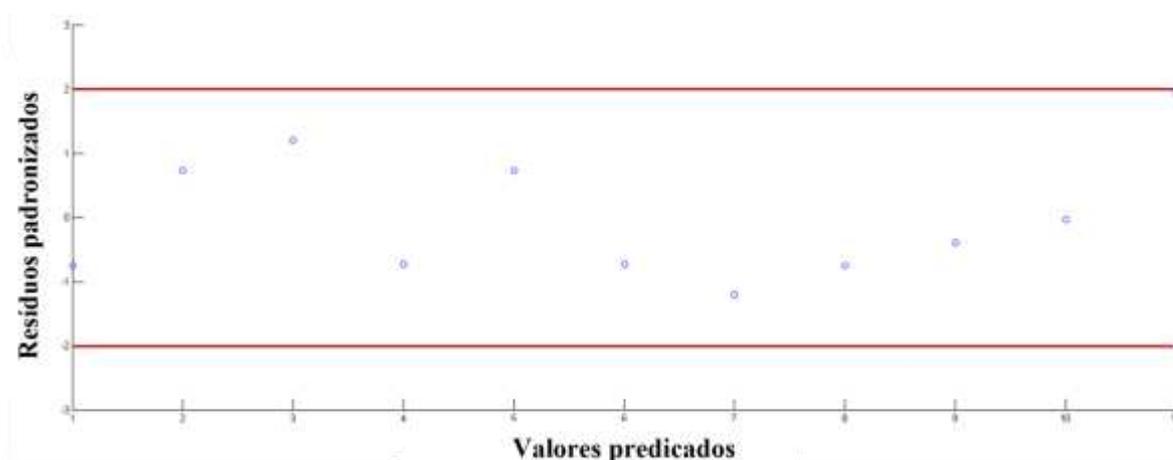


Figura 13: Gráfico residual versus os valores previstos para a validação do modelo de Metodologia de Superfície de Resposta.

Com base no modelo quadrático derivado de experimentos multivariados, confirmados por análises em triplicatas, foi determinado que as condições ótimas para maximizar a quantidade de picos detectáveis ocorrem em extrações com temperatura (T) de 40°C e tempo (t) de 30 minutos. A **Figura 14** compara cromatogramas de uma amostra aleatória, obtidos sob condições otimizadas e não otimizadas de HS-SPME.

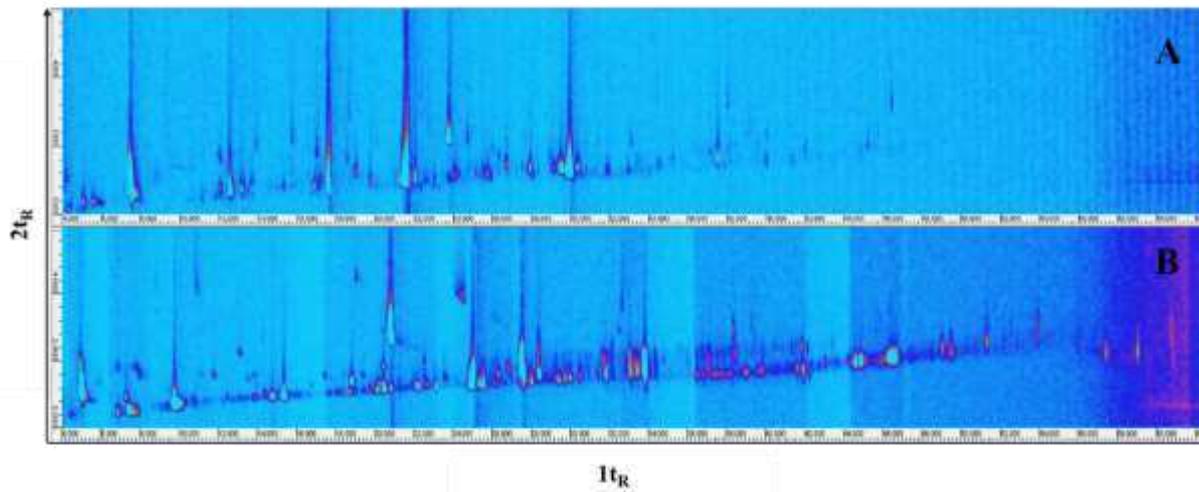


Figura 14: Cromatograma bidimensional da análise de uma amostra de cerveja obtida por HS-SPME-GC×GC-MS: (A) método não otimizado (T= 32°C e t = 22 min); (B) método otimizado (T= 40°C e t = 30 min).

De forma evidente, sob as condições otimizadas, o número de picos detectáveis aumenta consideravelmente nos experimentos otimizados. Além disso, é perceptível que a faixa de tempos de retenção na ¹D – e, portanto, a volatilidade e massa dos analitos – também se amplia. Embora a eficiência de extração, em termos da massa total de COVs isolados, possa não ser

umentada, os cromatogramas resultantes são certamente mais adequados para análises não direcionadas e perfis de amostras

4. CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DE CERVEJAS LAGER.

O método otimizado de HS-SPME-GC×GC-MS foi utilizado para analisar o perfil de compostos voláteis de 22 amostras de cervejas, classificadas de acordo com as indicações de estilo fornecidas pelos seus fabricantes.

De acordo com as Diretrizes de Estilos BJCP (Programa de Certificação de Juízes de Cerveja, *em inglês, Beer Judge Certification Program*)⁵, os estilos de cervejas analisadas neste trabalho. São cervejas pertencentes ao estilo American Lager. Essa é uma família de cervejas com características mais suaves e acessíveis a grande maioria dos consumidores e usadas para atrair as cervejas de consumidores das cervejas Lager.

Cervejas do estilo American Lager e Standard American Lager são caracterizadas por serem cervejas de malte com aroma leve, baixo aroma de lúpulo, baixo amargor e com adição de até 40 % de adjuntos, como arroz e milho. No Brasil, cervejas rotuladas como Pilsen, na verdade, são equivalentes em termos de produção a Standard American Lager. Cervejas do estilo Premium American Lager são descritas como cervejas com aroma de malte mais perceptível do que os estilos mencionados anteriormente, apresentando um aroma de lúpulo de intensidade média, caracterizando também um amargor de nível intermediário, com adição de até 25 % de adjuntos, como arroz e milho. Muitas das cervejas rotuladas como Premium American Lager no Brasil são popularmente conhecidas como puro malte⁵.

De acordo com o BJCP ao abordar estilos de cerveja, refere-se fundamentalmente ao conceito do estilo e identifica as características principais da composição e do procedimento de produção desse estilo. Cada estilo possui uma descrição claramente definida; no entanto, as cervejarias têm certa flexibilidade ao categorizar seus produtos. A classificação fornece designações que facilitam a referência, e é comum que muitos dos estilos estabelecidos por esse guia possuam termos alternativos ou sejam chamados por diferentes nomes em diversas regiões, ocasionalmente até mesmo dentro do mesmo território.¹⁻⁵. Portanto observa-se que não uma padronização clara para que os fabricantes possam classificar suas cervejas dentro de um determinado estilo. Nesse âmbito, diversos elementos podem contribuir para as disparidades nos perfis de compostos orgânicos voláteis, tornando crucial a obtenção de impressões digitais ricas

em informações químicas. Isso possibilita destacar até mesmo as diferenças mais sutis entre as amostras de cervejas ⁵.

Com o método otimizado, foi possível identificar nos cromatogramas, com análise visual, a diferença entre as impressões digitais de diferentes amostras, pertencentes ao mesmo estilo e entre os estilos diferentes. A Figura 15 apresenta os cromatogramas das amostras de cerveja agrupadas por estilos fornecidos pelo fabricante, após a otimização do método HS-SPME-GC×GC-QMS.

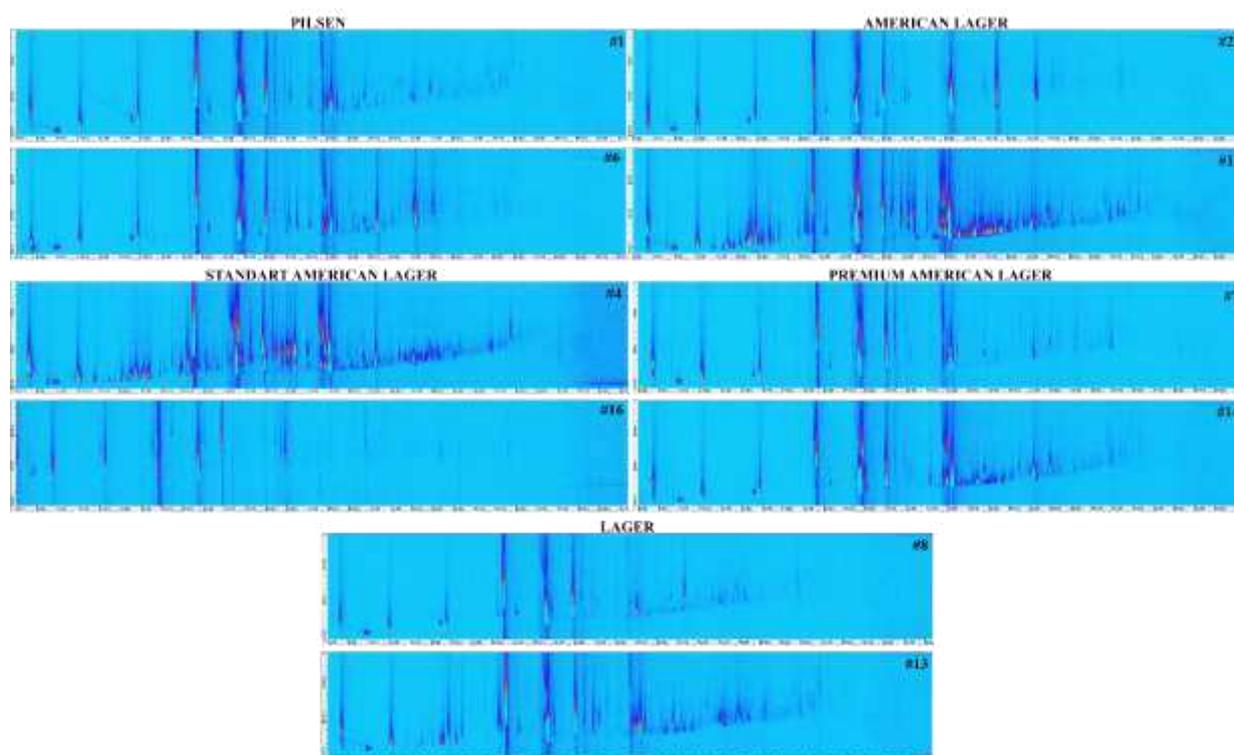


Figura 15: Cromatogramas bidimensionais de impressões digitais de amostras de cerveja agrupadas pelo estilo informado pelo fabricante, obtidos por meio do método otimizado HS-SPME-GC×GC-MS. # = códigos das amostras. # = códigos das amostras.

Os cromatogramas revelam diferenças na composição volátil das amostras de cerveja, as quais estão associadas às origens distintas dos ingredientes utilizados, variações nos processos de produção e à presença de aditivos e adjuntos. A falta de detalhamento nos rótulos das amostras ressalta a importância de adquirir um perfil cromatográfico minucioso dos VOCs para uma descrição precisa das características das amostras. A Tabela 6 exhibe os compostos identificados nas vinte e duas amostras, fornecendo insights sobre a origem dos ingredientes, o que é crucial para garantir a qualidade e segurança alimentar. Isso possibilita a detecção de quaisquer alterações que possam afetar as características sensoriais, sendo de suma importância para os consumidores de cerveja.

Tabela 5: Compostos identificados nas amostras pelo método otimizado HS-SPME-GC×GC-MS. (Continua).

Composto	CAS	t _R		Match	LTPRI		Amostras
		¹ D / min	² D / s		Exp.	Lit.	
1-propanol	71-23-8	9,13	4,82	651	585	568	3
<i>n</i> -hexano	110-54-3	10,13	3,57	917	610	623	3,5,6,7,10,12,17,21,22
acetato de etila	141-78-6	10,23	5,45	941	613	606	Todas
3-metilexano	589-34-4	12,23	4,10	827	664	672	3,5,12,17,21,22
2-metilexano	591-76-4	12,23	4,17	805	664	663	3,5,12,22
4-metil-1-hexeno	3769-23-1	12,43	4,62	674	669	665	2
<i>iso</i> -octano	540-84-1	13,03	4,27	914	685	683	3, 5,22
propionato de etila	105-37-3	13,53	1,07	603	698	706	3
3-metil-1-hepteno	4810-09-7	14,43	4,10	742	721	747	10
álcool amílico	71-41-0	14,53	1,02	912	723	760	Todas
2-metil-1-butanol	137-32-6	14,53	3,92	808	723	740	2,3,4,8,9,12,15,16,18,22
álcool isoamílico	123-51-3	14,63	5,02	811	726	732	9,12,20
tolueno	108-88-3	15,83	2,10	904	757	750	17
acetato de <i>iso</i> -butila	110-19-0	15,93	1,30	793	759	755	1,2,4,6,7,11,13,15,18,19,22
butirato de etila	105-54-4	17,03	1,57	825	787	794	Todas
2,4-dimetileptano	2213-23-2	18,93	4,82	591	836	823	5
<i>m</i> -xileno	108-38-3	19,93	2,85	885	862	848	5,17
etilbenzeno	100-41-4	19,93	2,95	877	862	839	3,12,21,22
acetato de isoamila	123-92-2	20,43	1,70	927	875	856	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22
acetato de amila	628-63-7	20,43	4,65	728	875	926	1,8,9,10,12,15,16,17,20,21
estireno	100-42-5	21,23	4,12	733	895	895	15
<i>p</i> -xileno	106-42-3	21,33	3,47	784	898	872	3,5,12,22
<i>o</i> -xileno	95-47-6	21,33	3,35	812	898	871	17
<i>iso</i> -butirato de <i>iso</i> -butila	97-85-8	22,23	1,02	874	921	899	4,13

Tabela 5: Compostos identificados nas amostras pelo método otimizado HS-SPME-GC×GC-MS. (Continua).

Composto	CAS	t _R		Match	LTPRI		Amostras
		¹ D / min	² D / s		Exp.	Lit.	
cumeno	98-82-8	22,83	2,72	712	936	930	18
α-thujene	2867-05-2	23,33	0,60	752	949	932	5,12
α-pinene	80-56-8	23,63	0,87	901	957	942	3,5,12,17,21,22
<i>m</i> -etiltolueno	620-14-4	24,43	3,07	727	977	968	17
propionato de amila	624-54-4	24,63	1,72	721	982	952	13
pseudocumeno	95-63-6	24,73	3,22	718	985	987	3,5,12,13,17,22
mesitileno	108-67-8	24,73	3,30	724	985	997	22
óxido gerânico	7392-19-0	25,13	1,22	764	995	971	4,12
<i>iso</i> -heptanoato de metila	2177-83-5	25,33	2,07	793	1000	963	4
β-pineno	18172-67-3	25,43	1,80	848	1003	980	1,2,3,5,6,7,11,12,15,17,22
caproato de etila	123-66-0	25,73	1,77	942	1010	996	Todas
β-mirceno	123-35-3	25,83	0,87	940	1013	992	4,12,13
pseudopineno	127-91-3	25,83	0,95	700	1013	984	20
acetato de hexila	142-92-7	26,23	1,67	687	1023	987	11
butirato de isoamila	106-27-4	26,63	1,40	813	1034	1061	12
2-etilbutirato de alila	7493-69-8	26,63	1,35	636	1034	995	6
4-metilenoexanoato de metila	73805-48-8	26,83	3,17	721	1039	1005	11,13
enantenato de metila	106-73-0	26,83	2,20	796	1039	1008	4
α-terpineno	99-86-5	27,03	1,82	807	1044	1020	4
<i>o</i> -cimeno	527-84-4	27,13	3,00	856	1046	1030	3,4,5,12,13,17,22
hidrato de <i>cis</i> -sabineno	15537-55-0	27,53	2,35	795	1057	1060	4
<i>D</i> -limoneno	5989-27-5	27,53	2,02	746	1057	1024	6,7,8,10
undecano	1120-21-4	28,03	5,17	807	1069	1061	10
α-ocimeno	502-99-8	28,13	1,42	754	1072	1057	4
2,6,7-trimetildecano	62108-25-2	28,93	5,22	792	1093	1058	21

Tabela 5: Compostos identificados nas amostras pelo método otimizado HS-SPME-GC×GC-MS. (Continua).

Composto	CAS	t _R		Match	LTPRI		Amostras
		¹ D / min	² D / s		Exp.	Lit.	
2-metildecano	6975-98-0	29,13	5,10	848	1098	1061	10, 12, 21
6-metileptanoato de metila	2519-37-1	29,43	2,00	788	1105	1068	4
2-nonanona	821-55-6	29,53	2,92	709	1108	1089	4
enantenato de etila	106-30-9	29,83	1,92	674	1116	1083	6,14
linalool	78-70-6	30,13	2,52	821	1123	1101	2,3,4,5,6,7,8, 13,14,15,17,19,21,22
nona-2,6-dien-1-ol	7786-44-9	30,13	3,67	690	1123	1156	19
4-metilundecano	2980-69-0	30,23	5,45	849	1126	1160	10, 12, 21
mirtetilato de metila	202527-57-9	30,43	1,97	707	1131	1160	13
álcool β-feniletílico	60-12-8	30,43	1,72	891	1131	1117	1,2,3,4,5,6,7,8,9,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22
<i>cis</i> -2-nonenal	60784-31-8	30,43	2,97	649	1131	1125	15
2-metilundecano	7045-71-8	31,13	5,05	722	1149	1160	21
2,3-dimetildecano	17312-44-6	31,43	5,32	687	1157	1155	21
ácido caprílico	124-07-2	33,23	1,72	762	1203	1183	9,12,13,14,15,19,22
4-etildecane	1636-44-8	33,53	5,55	776	1211	1200	12
caprilato de etila	106-32-1	33,73	1,37	959	1216	1178	Todas
acetato de caprila	112-14-1	34,23	2,02	763	1229	1211	1,9,15
α-ioneno	475-03-6	34,93	3,20	755	1247	1266	5,9,15,19
acetato de β-feniletila	103-45-7	35,73	3,27	944	1267	1258	1,2,3,4,5,6,7,8,9,11,12,13,14,15,16,17,18,19,21,22
deidro-ar-ioneno	30364-38-6	39,73	5,77	671	1370	1349	19
9-decenoato de etila	67233-91-4	40,33	2,77	773	1385	1389	1,2,6,7,8,11,12,14,21
β-damascenona	23726-93-4	40,53	4,87	777	1390	1382	1,2,3,5,6,7,8,9,13,14,17,18,19,20,21,22
5-metilnonanoato de etila	116530-40-6	40,83	3,87	629	1398	1395	2,5,10
caprato de etila	110-38-3	40,83	2,07	926	1398	1397	1,2,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22
cariofileno	87-44-5	42,53	3,17	889	1441	1420	11,12
<i>trans</i> -α-bergamoteno	13474-59-4	42,83	1,92	799	1449	1441	12

Tabela 5: Compostos identificados nas amostras pelo método otimizado HS-SPME-GC×GC-MS. (Conclusão).

Composto	CAS	t _R		Match	LTPRI		Amostras
		¹ D / min	² D / s		Exp.	Lit.	
<i>cis</i> -β-farneseno	28973-97-9	43,13	1,57	765	1457	1440	5,12,15,19
humuleno	6753-98-6	43,63	3,72	935	1470	1456	10,11,12,13,15,17,21
<i>cis</i> -α-bisaboleno	29837-07-8	43,63	3,72	804	1470	1494	1,2,6,9
γ-muuroleno	30021-74-0	44,13	3,32	850	1483	1477	12
α-selineno	473-13-2	44,63	4,15	805	1495	1494	12
butilidroxitolueno (BHT)	128-37-0	44,73	3,42	933	1498	1505	4,7,8,22
α-muuroleno	31983-22-9	44,83	3,35	825	1500	1500	12
aloaromadendreno	25246-27-9	44,93	3,80	825	1503	1462	12
<i>trans</i> -calameneno	73209-42-4	45,43	4,60	714	1516	1532	1,12
β-cadineno	523-47-7	45,53	3,15	864	1518	1518	12
²¹⁵	106-33-2	47,13	2,16	883	1559	1590	1,2,4,6,7,12,14,15,16,18,19,22

O método HS-SPME-GC×GC-QMS permitiu a identificação de 86 compostos voláteis, os quais podem ser empregados para avaliar as discrepâncias relacionadas às diversas origens dos ingredientes base utilizados na produção, bem como a presença de adjuntos e aditivos mencionados nos rótulos das amostras de cervejas. Entre esses compostos, foram identificados ésteres, álcoois superiores, hidrocarbonetos e ácidos carboxílicos. Essas classes de compostos descrevem o perfil sensorial característico de cada amostra de cerveja, sendo essenciais para determinar a qualidade do produto e garantir a segurança alimentar.

Os ésteres desempenham um papel fundamental na qualidade do perfil de aroma e sabor das bebidas. Alguns dos ésteres aromáticos mais proeminentes na cerveja, como acetato de etila (com aroma de solvente), caproato de etila, (com sabor e aroma azedo de maçã), acetato de isoamila (com aroma de banana), acetato de isobutil, feniletil acetato e octanoato de etila (com aromas de mel, frutas, rosas e flores), foram identificados em todas as amostras. Esses ésteres são sintetizados dentro das células de levedura durante o processo de fermentação e a difusão entre as células e o meio de fermentação é influenciada pela espécie de levedura utilizada e pela temperatura. A maior parte dos ésteres produzidos durante a fermentação permanece dentro das células das leveduras Lager, o que contribui para a sensação de leveza e suavidade característica dessa categoria de cerveja ^{1,216}.

Os álcoois superiores são uma classe de compostos que exercem uma influência significativa no perfil sensorial das cervejas. Originam-se durante o processo de fermentação, como resultado da atividade das leveduras, desempenhando também um papel crucial na formação de ésteres, essenciais para o aroma e sabor da bebida. Esses compostos são caracterizados por possuírem mais carbonos que o etanol, o álcool comum encontrado nas bebidas alcoólicas. Dois dos álcoois superiores mais comuns presentes nas cervejas são o 2-metil-1-butanol, também conhecido como álcool amílico, e o 2-metil-1-propanol, conhecido como álcool isobutílico. O álcool amílico frequentemente apresenta um aroma frutado, muitas vezes reminescente de bananas maduras, enquanto o álcool isobutílico pode conferir notas herbáceas ou picantes, embora em concentrações elevadas possa ter efeitos indesejáveis. A quantidade e a composição específica de álcoois superiores em uma cerveja podem variar conforme diversos fatores, incluindo o tipo de levedura empregada, a temperatura e o tempo de fermentação, bem como a composição do mosto utilizado ^{1,216}.

Os ácidos carboxílicos são componentes químicos presentes nas cervejas, desempenhando um papel relevante no aroma, sabor e estabilidade da bebida. Estes compostos se caracterizam pela presença do grupo funcional carboxila (COOH) e são gerados em diferentes etapas do processo de produção da cerveja, incluindo a fermentação e o envelhecimento. O ácido octanoico, também conhecido como ácido caprílico, identificado em algumas amostras, apresenta um aroma desagradável, gorduroso e rançoso, sendo excretado pelas leveduras em condições adversas. É notável que apenas o ácido octanoico tenha sido detectado em algumas amostras, o que é positivo para o aroma das cervejas analisadas, uma vez que é preferível encontrá-lo na forma de ésteres correspondentes, devido a importância dessa classe de compostos para descrição do perfil sensorial das cervejas. O perfil e a quantidade de ácidos carboxílicos na cerveja podem variar conforme a composição do mosto, o tipo de levedura utilizado, as condições de fermentação e o período de maturação¹.

Os hidrocarbonetos, como terpenos, são uma classe de compostos químicos que também podem estar presentes nas cervejas, embora em menor quantidade em comparação com outros componentes mais comuns, como álcoois, ésteres e compostos fenólicos. A presença e a concentração desses hidrocarbonetos nas cervejas podem variar dependendo do tipo de lúpulo utilizado, das condições de cultivo das plantas e das técnicas de produção da cervejaria¹.

Os terpenos são compostos orgânicos voláteis formados por unidades de isopreno (C₅). Esses hidrocarbonetos são tipicamente originados de matérias-primas como lúpulo, malte e até mesmo água. Os principais componentes incluem o mirceno (C₁₀), um monoterpene, e três Sesquiterpeno (C₁₅): cariofileno, Humuleno e farneseno^{1,216}.

O mirceno é um terpeno presente em todos os tipos de Lúpulo e é responsável por aromas de lúpulo fresco, com notas de frutas tropicais e cítricas. Já o Humuleno contribui para aromas de lúpulo terroso e herbal. O cariofileno pode adicionar notas condimentadas e picantes à cerveja, enquanto o farneseno oferece aromas florais e herbáceos.

O farneseno, ou (Z)-β-Farneseno, é um componente do óleo de lúpulo que apresenta aromas amadeirados, herbáceos, cítricos e florais. A presença ou ausência do farneseno pode variar entre variedades de lúpulo, sendo mais prevalente em algumas do que em outras. Por exemplo, o Lúpulo Saaz Theco é conhecido por conter níveis relativamente altos desse composto, representando aproximadamente 10 % a 20 % do total dos óleos presentes^{1,216}. Esta variedade de lúpulo é amplamente empregada na produção de cervejas Lager, que geralmente buscam apresentar características mais leves e suaves de lúpulo. Assim, é plausível afirmar que

as amostras que foram detectadas com farneseno provavelmente utilizaram o Lúpulo Saaz Theco.

O farneseno é raramente detectado em análises de cerveja devido à sua baixa concentração, a menos que a cerveja seja produzida utilizando a técnica de dry hopping com uma variedade que contenha esse composto ^{1,216}. Como as amostras analisadas neste estudo não foram submetidas ao processo de dry hopping, a detecção desse composto em algumas delas confirma a sensibilidade e resolução aprimoradas do método otimizado de HS-SPME-GC×GC-QMS. Isso permite a caracterização do perfil aromático das cervejas com informações detalhadas sobre sua composição.

Para diminuir a complexidade dos dados e facilitar a análise das amostras, permitindo a identificação visual das informações contidas nos rótulos, aplicou-se a Análise de Componentes Principais. Isso possibilitou visualizar e interpretar as variações nos *fingerprints* das vinte e duas amostras de cerveja e correlacioná-las com os dados dos rótulos. A Figura 16 apresenta o gráfico de pontuações do PCA, evidenciando algumas diferenças significativas nos perfis de compostos voláteis.

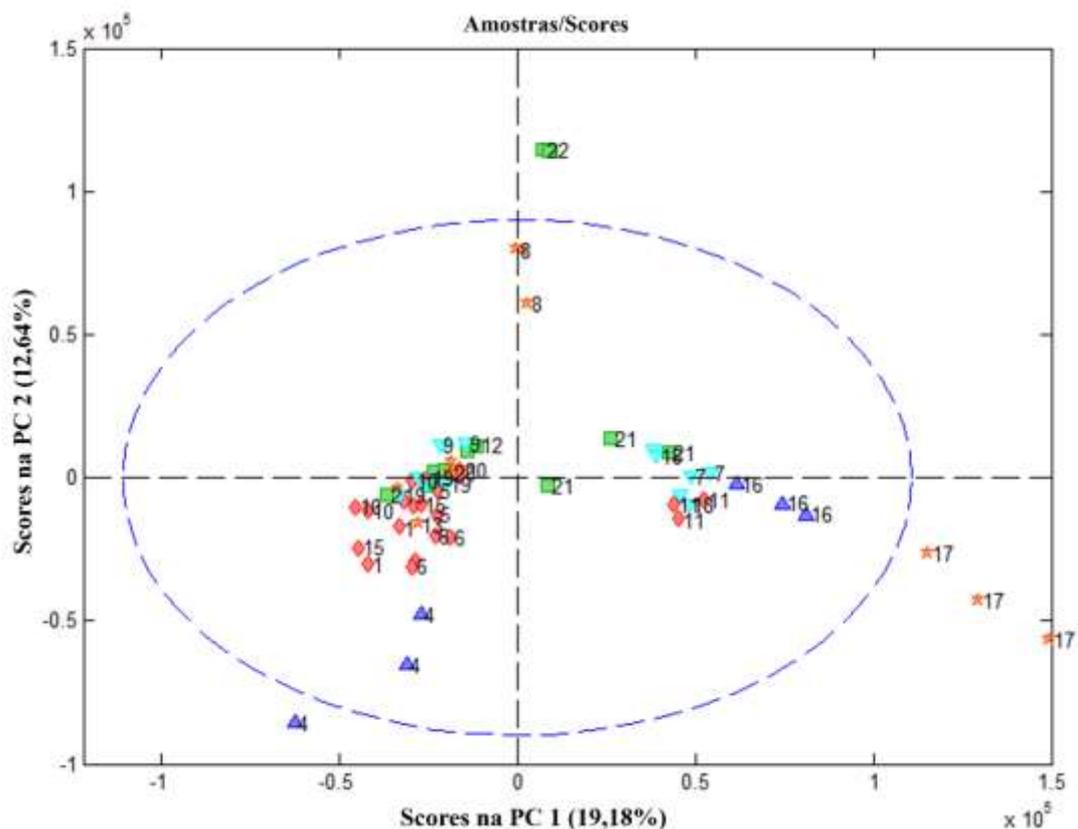


Figura 16: Gráfico de pontuações do PCA do *fingerprints* 22 amostras de cervejas Lager obtidos por HS-SPME-GC×GC. Os números referem-se as triplicatas das amostras e as formas geométricas os estilos: ▲ =Premium american Lager; ◆ = Pilsen; ★ = American Lager; ▼ = Lager; ■ = Standart American Lager.

Quando o PCA foi aplicado ao conjunto de dados dos *fingerprints*, foram selecionadas 2 componentes principais (PCs), as quais explicaram 31,83 % da variância total do modelo. A utilização de uma variabilidade relativamente baixa, ainda capaz de explicar o modelo, é atribuída à similaridade dos perfis cromatográficos, onde os compostos mais concentrados se destacam nas ferramentas analíticas, dificultando a obtenção de diferenças mais significativas entre as amostras. É importante ressaltar que este estudo constitui apenas uma análise exploratória, visando observar se as amostras que possuem uma rotulagem mais detalhada podem ser verificadas quanto à sua veracidade. Assim, o emprego de ferramentas de análise exploratória de dados pode elucidar algumas características importantes.

A consistência das informações sobre o tipo de adjunto é crucial para detectar qualquer adulteração nas cervejas. Na projeção no PC1, que explica 19,18 % da variação total do modelo, a base do malte emergiu como um fator interessante, dividindo as amostras em dois grupos distintos. A base do malte é a principal fonte de açúcares fermentáveis, utilizados pelas leveduras para produzir a maioria dos metabólitos secundários, que são um dos principais compostos aromáticos ativos na cerveja.

As amostras que indicavam cevada com adjuntos de milho (#16, #21, #8) e arroz (#22) em seus rótulos foram caracterizadas por pontuações positivas ou próximas de zero na PC1. Um estudo conduzido por Maia, C., et al.²⁷ revelou que a incorporação de milho e arroz reduz significativamente os aldeídos de envelhecimento e melhora a estabilidade. Outra pesquisa, realizada por Yorke, J., et al.²¹⁷, comparou o perfil sensorial de amostras com adjuntos de milho e arroz. Nestes estudos foi observado que o uso de arroz na fabricação de cerveja resulta em características sensoriais mais leves, indicando menor fornecimento de açúcares fermentescíveis, o que reduz o rendimento da fermentação e, conseqüentemente, a presença de metabólitos secundários^{27,217}. Por outro lado, a adição de milho pode induzir uma sensação mais rica na boca, devido ao maior fornecimento de açúcares fermentescíveis, resultando em uma maior concentração de metabólitos secundários durante a fermentação²¹⁷. Essas informações podem ser atribuídas aos compostos voláteis dessas cervejas, o que contribuem para a diferença no

fingerprints das amostras resultando em um o agrupamento das amostras em relação aos demais adjuntos utilizados.

Por outro lado, as amostras com pontuações negativas na PC1 continham em seus rótulos apenas informações sobre a composição do malte, como malte de cevada, ou malte de cevada com carboidratos ou cereais não maltados. O fato de essas informações serem bastante genéricas dificulta uma busca mais detalhada sobre o comportamento desse agrupamento e comparações dos impactos do uso de proporções de grãos de uma variedade de cereais não maltados.

No entanto, a amostra #17 apresentou pontuações positivas na PC1, em vez de negativas. A amostra informa em seu rótulo que o malte é feito somente de cevada. Esse fato pode levantar duas possibilidades que precisam ser investigadas para uma conclusão adequada: ou a amostra é realmente uma cerveja de puro malte, sugerindo que outras amostras rotuladas como malte puramente de cevada podem estar incorretamente rotuladas, ou essa amostra não é fabricada apenas com malte puro e inclui a adição de um adjunto. Considerando que ela está agrupada no conjunto onde estão predominantemente amostras com adjuntos de milho e arroz, poderíamos inferir que parte do seu malte poderia ser complementada com um desses adjuntos.

As amostras #7 e #11 são outro exemplo interessante, pois, apesar de informar que seu malte é feito de cevada e carboidratos, apresentaram pontuações positivas na PC1, onde estão agrupadas as amostras que indicam o uso de milho e arroz como adjunto. Isso sugere a possibilidade de que esses carboidratos sejam provenientes de milho ou arroz. No entanto, uma análise mais detalhada seria necessária para determinar com precisão qual desses carboidratos foi utilizado.

Além disso, a amostra #6, que especifica o uso de mandioca como adjunto em seu rótulo, apresentou pontuações negativas na PC1. Isso sugere que os carboidratos adicionados às amostras com pontuações negativas na PC1 podem ser diferentes do uso exclusivo de milho ou arroz. A mandioca é um adjunto caracterizado pela menor quantidade de enzima amilases, o que resulta na redução da quantidade de açúcares fermentáveis no mosto. Esse fato tem um impacto direto na produção de metabólitos secundários pelas leveduras durante a fermentação. A consequente redução desses metabólitos gera um *fingerprints* distinto para essa amostra em comparação com o *fingerprints* das amostras que contêm apenas um tipo de adjunto, como milho ou arroz ²¹⁸.

A PC2, responsável por explicar 12,64 % da variação, destacou diferenças mais sutis nos perfis cromatográficos, possivelmente devido à presença de aditivos e procedências dos

ingredientes utilizados. A PC2 caracterizada pelas pontuações negativas, podem ser atribuídas a presença de aditivos. A amostra #4 utiliza aditivos em sua produção e caracterizada com pontuações negativas na PC2. Essa é uma amostra de cerveja que utiliza cascas de laranja para atribuir notas cítricas e frutadas à cerveja. As cascas de laranja são ricas em óleos essenciais, compostos aromáticos e ácidos orgânicos, que são liberados durante o processo de maceração ou fervura na preparação da cerveja.

Os óleos essenciais presentes nas cascas de laranja e no Lúpulo geralmente contêm terpenos, como o limoneno e o linalol, que proporcionam aromas cítricos característicos, enquanto os ácidos orgânicos contribuem para um toque de acidez refrescante¹. Esses compostos podem complementar os sabores maltados e lupulados da cerveja, adicionando complexidade e equilíbrio ao produto. Contribuindo para obtenção de um perfil cromatográfico com uma maior abundância de compostos voláteis (ver Anexo I).

A adição de cascas de laranja pode ser feita em diferentes estágios do processo de produção da cerveja, como durante a fervura, a fermentação ou mesmo na maturação. A quantidade e o momento da adição podem variar de acordo com o estilo desejado e as preferências do cervejeiro, resultando em uma ampla variedade de cervejas que vão desde as mais sutis e equilibradas até as mais intensamente cítricas^{1,219}.

A PC2 positiva pode ser atribuída à procedência dos ingredientes. Apesar das informações genéricas, as amostras #8 e #22, que receberam pontuações positivas na PC2, podem ter seus *fingerprints* influenciados pelas origens dos adjuntos utilizados. É sabido que as características do malte^{186,217,220-222} têm um impacto direto no fornecimento de amido, que será convertido em açúcares fermentáveis, resultando em uma diversidade de metabólitos que também podem variar em concentração, levando a diferenças nos perfis.

Em resumo, a análise dos compostos voláteis presentes na cerveja presentes na cerveja podem dar uma tentativa de indicação não apenas sua composição, mas também insights sobre o processo de fabricação e as leveduras utilizadas. Essas informações destacam a importância do controle de qualidade e da padronização dos processos na indústria cervejeira.

5.CONCLUSÕES

A análise detalhada dos compostos voláteis presentes nas amostras de cerveja, conduzida através do método HS-SPME-GC×GC-MS, revelou uma ampla gama de componentes que

desempenham papéis cruciais no aroma, sabor e estabilidade da bebida. A identificação de 151 compostos voláteis, incluindo ésteres, álcoois superiores, ácidos carboxílicos e hidrocarbonetos, proporcionou insights valiosos sobre o perfil sensorial distintivo de cada amostra, além de permitir a avaliação das discrepâncias associadas à presença de adjuntos e aditivos mencionados nos rótulos.

A aplicação do método otimizado de HS-SPME-GC×GC-MS permitiu uma análise abrangente do perfil de compostos voláteis em 22 amostras de cervejas Lager industrializadas no Brasil. Conforme as Diretrizes de Estilos BJCP, não foi possível correlacionar as impressões digitais aos estilos fornecidos pelos fabricantes. Isso ressalta a flexibilidade na categorização dos produtos pelos fabricantes, o que pode resultar em algumas disparidades na classificação dos estilos e destaca a importância das técnicas analíticas como o HS-SPME-GC×GC-MS para fornecer impressões digitais detalhadas das cervejas.

O estudo identificou diferenças nas impressões digitais das 22 amostras que podem ser correlacionadas à qualidade e origem dos ingredientes utilizados, além da presença de aditivos que complementam as notas aromáticas. Essas descobertas fornecem informações relevantes para a indústria cervejeira, contribuindo para aprimorar o controle de qualidade e a produção de cervejas com perfis sensoriais específicos. Além disso, a análise dos compostos voláteis nas cervejas revelou insights sobre o processo de fabricação, as cepas de leveduras utilizadas e a procedência dos ingredientes, destacando a importância do controle de qualidade e da padronização dos processos na indústria cervejeira para garantir a consistência, autenticidade e qualidade das cervejas produzidas.

A análise dos *fingerprintss* das amostras de cerveja por meio do PCA proporcionou insights valiosos sobre a composição e a qualidade das diferentes amostras. Embora os dois componentes principais selecionados tenham explicado apenas 31,83 % da variação total do modelo, esta análise exploratória foi fundamental para verificar a veracidade das informações contidas nos rótulos das cervejas. A consistência das informações sobre o tipo de adjunto foi identificada como crucial para detectar possíveis adulterações nas amostras, destacando a importância do controle de qualidade em toda a cadeia de produção cervejeira. Além disso, a análise possibilitou a identificação de padrões sutis relacionados à origem dos ingredientes utilizados, o que pode ser de grande relevância para as indústrias cervejeiras. Essa capacidade de identificar diferenças nos perfis de compostos voláteis pode ser crucial para detectar possíveis falhas ou discrepâncias nos ingredientes em tempo real. Isso permite às indústrias agirem rapidamente para corrigir problemas e garantir a qualidade consistente de seus produtos.

Em resumo, a análise dos compostos voláteis presentes nas cervejas forneceu insights não apenas sobre sua composição, mas também sobre o processo de fabricação e as cepas de leveduras utilizadas. Essas descobertas sublinham a importância do controle de qualidade e da padronização dos processos na indústria cervejeira, visando garantir a consistência e a autenticidade das cervejas produzidas.

CAPÍTULO 3

**DADOS DE CROMATOGRAFIA GASOSA COMO UMA FERRAMENTA
AUXILIAR PARA PREDIZER CARACTERÍSTICAS SENSORIAIS DE
CERVEJAS**

1. INTRODUÇÃO

A cerveja, uma das bebidas mais antigas e consumidas globalmente, é produzida com água, cevada, lúpulo e levedura. Seu processo de fabricação envolve várias etapas, resultando em diversos estilos e tipos de cerveja. O aroma das cervejas, influenciado por compostos orgânicos voláteis, é um indicador crucial de qualidade e originalidade, sendo determinado pelas matérias-primas, processo de fabricação e condições de armazenamento. O perfil desses compostos voláteis pode garantir a autenticidade dos produtos, além de melhorar o processo de fabricação, monitorar sua qualidade e estudar sua relação sensorial ^{216,223}.

A relação entre os compostos voláteis e o paladar das cervejas resulta de um equilíbrio entre os diversos compostos das matérias-primas. A combinação de sabor e odor é crucial para a aceitação do produto pelos consumidores. Por isso, é fundamental integrar análises químicas com avaliações sensoriais para garantir a qualidade, aceitação e descrição das características sensoriais das cervejas. Existem três grupos de testes sensoriais, incluindo testes descritivos e de escala hedônica, como a Análise Descritiva Quantitativa, que permitem identificar e quantificar os atributos sensoriais das cervejas, possibilitando a caracterização e comparação entre elas ^{224,225}.

Em geral, as análises de compostos orgânicos voláteis em cervejas requerem uma etapa inicial de preparo de amostra. Técnicas de extração por headspace são preferíveis, pois permitem a exclusão de compostos não voláteis, como açúcares, que podem danificar os equipamentos de análise. Entre as técnicas de preparo de amostra mais utilizadas, destaca-se a microextração em fase sólida no modo headspace, considerada uma das mais adequadas para a análise de VOC. Atualmente, os estudos que investigam o perfil de sabor e aroma de cervejas concentram-se na análise de compostos orgânicos voláteis isolados por HS-SPME e analisados por Cromatografia Gasosa unidimensional convencional (1D-GC) ^{11,91,148,158,199,200}. No entanto, o uso da Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente, especialmente quando combinada com espectrometria de massas (MS), tem se mostrado uma alternativa poderosa para a caracterização do perfil dos voláteis em amostras alimentícias, devido à sua maior resolução cromatográfica e sensibilidade elevada ^{192,193}.

No atual contexto, a combinação de HS-SPME-GC×GC-MS/MS tem se destacado como uma ferramenta poderosa para a análise dos compostos voláteis que compõem o perfil de VOC em matrizes complexas e multicomponentes. No entanto, a complexidade dos dados gerados por meio desta técnica apresenta desafios na análise e interpretação desses dados ¹³⁴.

Os dados obtidos podem ser processados usando ferramentas quimiométricas, permitindo a extração de informações químicas relevantes relacionadas às amostras. Esses métodos visam analisar qualitativamente os dados analíticos, reduzir o tempo de tratamento e aumentar a capacidade de determinar diferenças proeminentes entre as amostras, além de permitir a correlação desses resultados com as propriedades medidas ¹³⁴. Antes da aplicação dos métodos de análise quimiométrica em dados GC×GC-MS, geralmente é necessário realizar um pré-processamento. As etapas comuns incluem redução de ruído, correção da linha de base, normalização e alinhamento de tempo ¹³⁵.

O iPLS-DA, baseado em mínimos quadrados parciais de análise discriminante intervalar, é uma ferramenta eficaz para interpretação de dados. Esse método é amplamente utilizado para seleção e interpretação de variáveis, reduzindo a dimensionalidade dos dados brutos por meio de variáveis latentes (LVs). No iPLS-DA, as regiões de picos nos cromatogramas são divididas em intervalos, cada um usado para treinar um novo modelo PLS-DA, fornecendo informações sobre a correlação dos intervalos do cromatograma com a variável dependente ^{226,227}.

O estudo apresentado neste capítulo detalha estratégias para analisar o perfil de compostos voláteis que influenciam o aroma das cervejas Lager, utilizando HS-SPME-GC×GC-MS e sua correlação com a avaliação sensorial. Esta abordagem integra ferramentas analíticas poderosas, como iPLS-DA e HS-SPME-GC×GC-MS/MS, para discriminar entre os atributos de sabor do grão, sabor do lúpulo, aroma do lúpulo e amargor, distinguindo entre fortes e fracos. Além disso, esses dados foram explorados para investigar a levedura utilizada, as características das matérias-primas, o processo de produção e a classificação indicada no rótulo das amostras de cervejas Lager. O modelo iPLS-DA desenvolvido foi validado externamente usando um conjunto de dados de teste. Também será abordada a adequação da técnica HS-SPME-GC×GC-MS, em conjunto com a quimiometria, como uma ferramenta para testes rápidos de autenticidade dos ingredientes utilizados e sua correlação com os atributos sensoriais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes E Materiais

Vinte e duas amostras de cervejas rotuladas pelos fabricantes como lagers e disponíveis comercialmente foram utilizadas. Para a HS-SPME, utilizou-se barra magnética lisa 7x20 mm, *vials* de 22 mL com tampas e septos apropriados e fibra de SPME com o recobrimento Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) (Supelco, Bellefonte, CT, EUA). Para o controle da força iônica utilizou-se uma solução saturada de NaCl (LABSYNTH, Produtos para

Laboratório Ltda, Diadema-SP) preparada em água deionizada em aparelho Mili-Q[®]. No estudo das características sensoriais, para a ativação da memória sensorial dos painelistas foram empregados padrões dos atributos avaliados: cafeína para amargor, lúpulo para sabor e aroma do lúpulo e cevada para sabor do grão.

2.2 GC×GC

As análises foram realizadas em um protótipo de GC×GC-MS feito em laboratório, baseado em um GC QP2010 Ultra (Shimadzu Corp, Tóquio, Japão) equipado com um detector seletivo de massa TQ8030, um injetor split/splitless e equipado com um modulador criogênico selado em duas etapas miniaturizado que fornecia jatos frios ($T = -196\text{ }^{\circ}\text{C}$) e quentes ($T = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$) controlados por válvulas solenoides (ASCO, Florham Park, NJ—EUA) e uma placa de microcontrolador Duemilanove de 8 bits (Arduino, Ivrea, Itália). As condições operacionais foram adaptadas de estudos anteriores. O período de modulação foi ajustado para 6,0 s. O conjunto de colunas consistiu de uma coluna de $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm} \times 0,25\text{ }\mu\text{m}$ Rxi-5Sil MS (Restek Corp., Bellefonte - PA, EUA) acoplada a uma coluna DBWax (Agilent, Santa Clara - CA, EUA) de $100\text{ cm} \times 0,10\text{ mm} \times 0,10\text{ }\mu\text{m}$ como segunda dimensão (2D). A programação da temperatura do forno foi inicialmente ajustada para $T = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$, depois elevada para $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, em seguida para $T = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A porta de injeção foi mantida a $T = 230\text{ }^{\circ}\text{C}$, usando hidrogênio como gás de arraste a uma vazão inicial de $1,2\text{ mL}/\text{min}$. A linha de transferência MS e a fonte de ionização foram ajustadas para $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a faixa de varredura de massa foi definida de $m/z = 40$ a 500 Da , resultando em uma taxa de aquisição espectral de 25 Hz . A identificação de picos foi realizada utilizando as bibliotecas de espectros NIST 2008 combinadas com inspeção dos índices de retenção de programação de temperatura linear correspondentes (LTPRI). Cromatogramas bidimensionais brutos foram gerados utilizando o software GCImage (Zoex Corp., Houston, TX, EUA).

2.3 Análise sensorial

As análises sensoriais foram conduzidas no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Alimentos e Nutrição (DEPAN) da Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA / UNICAMP). Foram conduzidas nove sessões de treinamento com provadores voluntários que avaliaram as amostras em triplicata. Inicialmente foi feito o treinamento, dos provadores, que nesta etapa avaliaram amostras de cervejas às quais haviam sido adicionados padrões para destacar os níveis fraco ou forte dos atributos sensoriais em consideração: cafeína (amargor), cevada moída (sabor de grão) e lúpulo em peletes (sabor e aroma do lúpulo). As concentrações

dos padrões para cada atributo, correspondentes respectivamente aos níveis fraco e forte, foram: 5 e 15 mg mL⁻¹ (cafeína, amargor); 50 e 150 mg mL⁻¹ (cevada moída, sabor de grão) e 5 e 25 mg mL⁻¹ (lúpulo em paletes). O treinamento foi realizado em cabines individuais com apresentação monádica das amostras por provador. Os dados obtidos para cada provador e atributo foram inspecionados por Análise da Variância (ANOVA). As fontes de variação foram “amostra” e “repetição” e os níveis de significância (p) de F para esses dois fatores foram computados para cada provador, em cada atributo. Somente os provadores que apresentaram capacidade discriminativa (p de $F_{amostra} < 0,50$), reprodutibilidade de julgamentos (p de $F_{repetições} > 0,05$) foram selecionados para compor a equipe descritiva final. Após o treinamento, os provadores avaliaram as amostras atribuindo a cada uma delas scores numéricos variando de zero a 5 unidades correspondentes à intensidade de cada um dos quatro atributos avaliados, em comparação às amostras dopadas apresentadas no treinamento.

2.4 HS-SPME

As amostras de cerveja eram descarbonatadas por congelamento em nitrogênio líquido (N_{2(l)}) imediatamente antes das análises. O procedimento foi otimizado para minimizar a perda de voláteis, assim como oxidação ou degradação térmica de componentes das amostras. Após a abertura da lata ou garrafa da cerveja, o líquido era prontamente e cuidadosamente vertido em um becker resfriado em N_{2(l)}. Após 5 min, o recipiente com a amostra congelada era removido do banho de N_{2(l)} e deixado em repouso até temperatura ambiente, eliminação completa do CO₂ e descongelamento da amostra. Uma alíquota de 8,0 mL de amostra descarbonatada e descongelada era transferida para um frasco de extração de 22 mL e adicionada de 2,0 mL de solução aquosa saturada de NaCl. A solução de amostra era termostaticada a 40 °C e deixada sob agitação magnética por 5 min; imediatamente em seguida uma fibra de SPME recoberta com 65 µm PDMS/DVB exposta ao *headspace* da solução por 30 min. Após a extração, a fibra era imediatamente inserida no injetor do sistema GC×GC-QMS para desorção dos analitos extraídos, sua separação e detecção.

2.4 Processamento dos dados cromatográficos.

Cada um dos 22 cromatogramas brutos de íons totais, obtidos em triplicatas, foi convertido em arquivos de texto e exportado para o software Matlab® R2014a (MathWorks, Natick-MA, EUA). Antes da modelagem quimiométrica, os cromatogramas foram alinhados ao longo do eixo do tempo usando *icoshift*²²⁸, corrigidos em relação à linha de base usando o algoritmo *wlsbaseline*, centrados na média e normalizados.

Os modelos de classificação multivariada foram desenvolvidos com o algoritmo PLS-DA que é um método de regressão linear que busca encontrar as variáveis latentes (LVs) que maximizam a covariância entre as variáveis independentes e dependentes (denominadas X e Y, respectivamente ²²⁹). Entretanto, para este conjunto de dados, foi necessário utilizar intervalos selecionados que permitissem uma melhor discriminação entre forte e fraco para os atributos sensoriais avaliados. Assim, o iPLS-DA foi empregado, utilizando um algoritmo que seleciona intervalos que melhor discriminam as classes para cada atributo sensorial (sabor do grão, sabor e aroma do lúpulo e amargor) ^{226,228,230}. Para cada atributo, foi criado um modelo preditivo para as 22 amostras de cervejas. Os atributos sensoriais foram transformados em um vetor Y lógico (1 = forte para o atributo e 0 = fraco para o atributo) seguindo um critério de ordem crescente dos dados da ADQ, em que das 11 amostras com maiores notas foram classificadas como pertencentes à classe 1 (forte para o atributo estudado) e as 11 amostras com menores notas foram classificadas como pertencentes à classe 0 (fraco para o atributo estudado). O modelamento foi realizado na plataforma MatLab, utilizando o PLS-Toolbox 7.5 (Eigenvector Research, Inc., Manson, WA, EUA).

3.0 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Análise Sensorial

Após o treinamento e seleção dos 14 provadores para integrar a equipe sensorial descritiva, nove foram aprovados para seguir nas próximas etapas. A capacidade discriminativa e a repetibilidade dos julgamentos de cada provador foram avaliadas em relação à discriminação das amostras e à consistência dos resultados obtidos.

Dentre as características sensoriais atribuíveis aos estilos e suas famílias, apenas as relacionadas ao malte, amargor e lupulados foram selecionadas. Essa escolha é devido ao fato de serem atributos que podem ser estudados em diferentes intensidades e correlacionados com o perfil volátil das cervejas⁴⁹. A Figura 17 apresenta essas características, seus significados e como podem influenciar no sabor e aroma das cervejas.



SABOR E AROMA	SIGNIFICADO
MALTE	Sabor de malte
AMARGO	Amargor
LUPULADO	Sabor e aroma de Lúpulo
TORRADO	Sabor do grão torrado
DOCE	Doçura residual perceptível
DEFUMADO	Sabor de malte ou grão defumado
ACIDO	Acidez perceptível
AMADEIRADO	Tempo de madeira ou barril
FRUTADO	sabor ou aroma perceptível de fruta
ESPECIARIAS	sabor ou aroma perceptível de especiarias

Figura 17: Características sensoriais atribuíveis aos estilos e suas famílias, com destaque para as características sensoriais avaliadas no presente estudo.

Dos nove provadores selecionados para compor a equipe sensorial descritiva, observou-se uma boa repetibilidade e capacidade de discriminação das amostras de referência. Isso foi avaliado pelo nível de significância (p) por provador em cada atributo sensorial⁴⁹. A Figura 18 apresenta um esquema da ordem para a ADQ das amostras de cervejas industrializadas do estilo Lager.

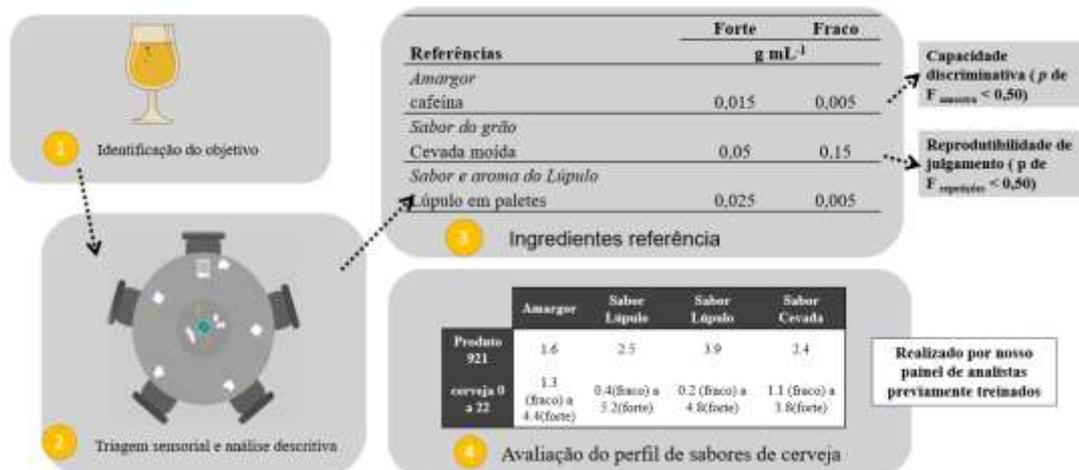


Figura 18: Esquema do processo de Análise Descritiva Quantitativa das amostras.

A Tabela 6 e Figura 19 mostra a média de intensidade dos atributos sensoriais avaliados pelos provadores para descrever o perfil sensorial das amostras de cerveja.

Tabela 6: Atributos sensoriais determinados para as amostras de cerveja.

Atributos ²

#	Estilos ¹	Amargor	Sabor Lúpulo	Aroma Lúpulo	Sabor Grão
1	PIL	1,9 ± 2,2	0,6 ± 0,5	0,5 ± 0,5	1,7 ± 1,9
2	PIL	2,6 ± 1,7	2,0 ± 2,0	1,6 ± 2,1	3,2 ± 2,7
3	PIL	3,0 ± 2,6	1,4 ± 1,3	1,0 ± 1,4	1,7 ± 1,6
4	SAL	4,3 ± 2,8	4,9 ± 3,0	4,8 ± 3,0	3,0 ± 1,3
5	SAL	1,6 ± 2,1	0,4 ± 0,6	0,2 ± 0,3	1,1 ± 1,3
6	PIL	4,0 ± 2,2	2,4 ± 1,4	1,9 ± 1,6	3,5 ± 1,7
7	PAL	1,7 ± 1,8	0,6 ± 0,8	0,7 ± 1,1	1,6 ± 1,8
8	SAL	4,4 ± 2,1	2,6 ± 1,9	1,6 ± 1,1	3,8 ± 2,3
9	PAL	2,4 ± 2,0	2,0 ± 1,9	1,9 ± 2,1	2,5 ± 1,9
10	PIL	1,3 ± 1,2	1,3 ± 1,6	1,2 ± 1,6	1,1 ± 0,6
11	PAL	2,5 ± 2,5	1,0 ± 1,3	0,8 ± 1,3	1,9 ± 1,8
12	SAL	4,4 ± 2,0	5,2 ± 2,5	3,3 ± 1,9	3,4 ± 1,9
13	AMB	2,2 ± 1,9	1,8 ± 2,0	1,5 ± 1,7	2,5 ± 2,3
14	PAL	4,3 ± 2,0	2,9 ± 1,8	2,4 ± 2,2	3,6 ± 2,3
15	PAL	2,4 ± 1,9	1,2 ± 1,1	1,0 ± 1,1	2,4 ± 1,6
16	PIL	1,3 ± 1,7	0,6 ± 0,7	0,5 ± 0,6	1,8 ± 2,1
17	SAL	2,0 ± 1,8	1,8 ± 1,7	2,2 ± 2,2	2,4 ± 2,3
18	PAL	3,1 ± 2,2	2,2 ± 2,3	2,0 ± 2,3	1,2 ± 1,2
19	SAL	1,6 ± 2,3	1,2 ± 1,5	1,1 ± 1,5	1,4 ± 1,7
20	SAL	2,0 ± 2,2	1,3 ± 1,6	1,1 ± 1,7	1,6 ± 1,7
21	SAL	3,1 ± 1,9	1,8 ± 1,2	1,6 ± 1,5	2,8 ± 1,9
22	SAL	3,0 ± 2,1	1,9 ± 1,6	1,7 ± 1,8	2,7 ± 2,3

Notas: 1: PIL = Pilsen; 2 = SAL: Lager / American Lager / Standard American Lager; PAL = Premium American Lager e AMB = Standard Amber Lager; 2: Média ± desvio padrão.

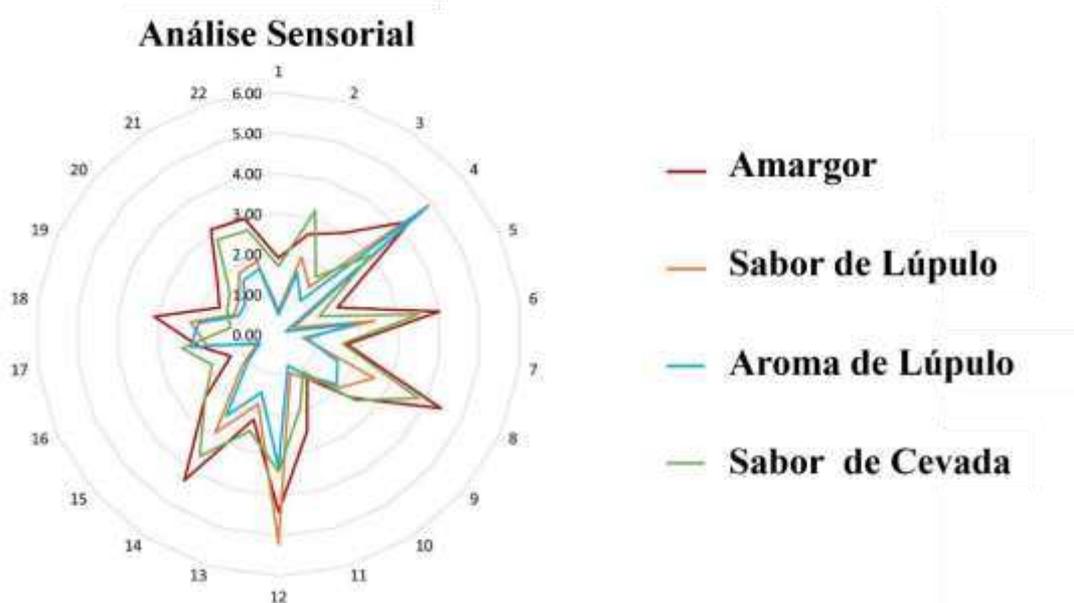


Figura 19: Análise das propriedades aromáticas das vinte e duas amostras.

Conforme a Tabela 7, foi observado que alguns atributos sensoriais apresentaram desvio

padrão superior à nota de intensidade atribuída pelos provadores. Esse resultado pode ser atribuído à divergência na percepção do conjunto sensorial, onde os provadores podem utilizar diferentes partes da escala para descrever a mesma sensação percebida em uma amostra. De acordo com Stone et al ²³¹, esse é um fenômeno comum em análises descritivas, denominado efeito amostra. Além disso, a análise descritiva realizada em curto prazo, na qual os provadores experimentaram uma grande quantidade de amostras de cerveja em um curto período, pode ter sido um fator que contribuiu para o efeito amostra. Com o intuito de reduzir o efeito amostra, ou seja, permanência do sabor residual na boca após as amostras terem sido deglutidas, os painelistas foram submetidos a uma pausa de um minuto entre cada amostra e foram orientados a beber pelo menos dois goles de água e comer biscoitos sem sal durante esse intervalo para limpar o paladar.

O perfil sensorial das 22 amostras de cervejas Lager foi descrito com intensidade entre 0 e 6, como pode ser visto no gráfico radar da Figura 19. Nenhuma amostra teve seus atributos avaliados como extremamente forte, ou seja, com valor próximo a nove na escala hedônica. Esses resultados, obtidos por meio da análise descritiva quantitativa, mostraram que os atributos avaliados estão de acordo com o que é encontrado na literatura⁵ para cada estilo de cerveja, e podem ser estudados, avaliados e até classificados por meio da obtenção do *fingerprints* dessas amostras.

Segundo os fabricantes das amostras, elas são classificadas como Pilsen, Lager, American Lager, Standard American Lager, Premium American Lager e Standard Amber Lager. De acordo com as diretrizes do BJCP Style Guidelines (Beer Judge Certification Program)⁵, as cervejas do estilo Lite American Lager e American Standard Lager são descritas como cervejas com baixo aroma de malte, baixo aroma de lúpulo, baixo amargor e com adição de até 40 % de adjuntos como arroz e milho. No Brasil, há uma grande diversidade de cervejas rotuladas como Pilsen, mas na verdade são pertencentes ao estilo Lite American Lagers⁵.

As cervejas Premium American Lager são descritas como cervejas com aroma de malte mais perceptível do que os estilos citados acima, aroma de lúpulo de intensidade média, caracterizando também um amargor de nível médio e com adição de até 25 % de adjuntos como arroz e milho. Muitas das cervejas rotuladas como Premium American Lager são mais conhecidas popularmente no Brasil, como puro malte⁵.

3.2 HS-SPME- GC×GC-MS

A HS-SPME é um processo baseado em equilíbrios simultâneos em um sistema multifásico²³²⁻²³⁴ para extrair os VOC que compõem o *fingerprints* de amostras de cerveja. Essa

metodologia é amplamente empregada na obtenção do perfil aromático de cervejas, como descrito em diversas publicações ^{85,86,88,91,93,141,142,146,148,189,194-198}. Ao empregar a fibra revestida com PDMS/DVB, a HS-SPME demonstrou uma consistente repetibilidade e reprodutibilidade das amostras, além de estabelecer uma relação satisfatória entre os parâmetros de extração e o isolamento dos VOC. Isso viabilizou a obtenção do *fingerprints* de cada amostra de cerveja por meio da análise GCxGC-QMS, o que delineou o perfil aromático de cada amostra e facilitou a identificação de discrepâncias nos atributos sensoriais e estilos das amostras.

Na análise por GCxGC-QMS, foi empregado o processo de modulação térmica criogênica com configuração de dois estágios com jato único, que compreende um jato frio de $N_{2(l)}$ e um jato quente de $N_{2(g)}$. Essa técnica demonstra eficácia no isolamento dos segmentos eluentes da primeira coluna e reinjetado na segunda coluna de maneira contínua e sequencial ao longo da análise ²⁰². Adicionalmente, essa configuração de modulação elimina as chances de sub-amostragem na separação ¹D, evitando assim a perda de informação analítica ²³⁵. Os cromatogramas bidimensionais das amostras #4, #16 e #17, foram categorizadas sensorialmente como tendo amargor forte, médio e fraco, respectivamente, estão ilustrados na Figura 20. Os cromatogramas das demais amostras podem ser encontrados no material suplementar (Apêndice D).

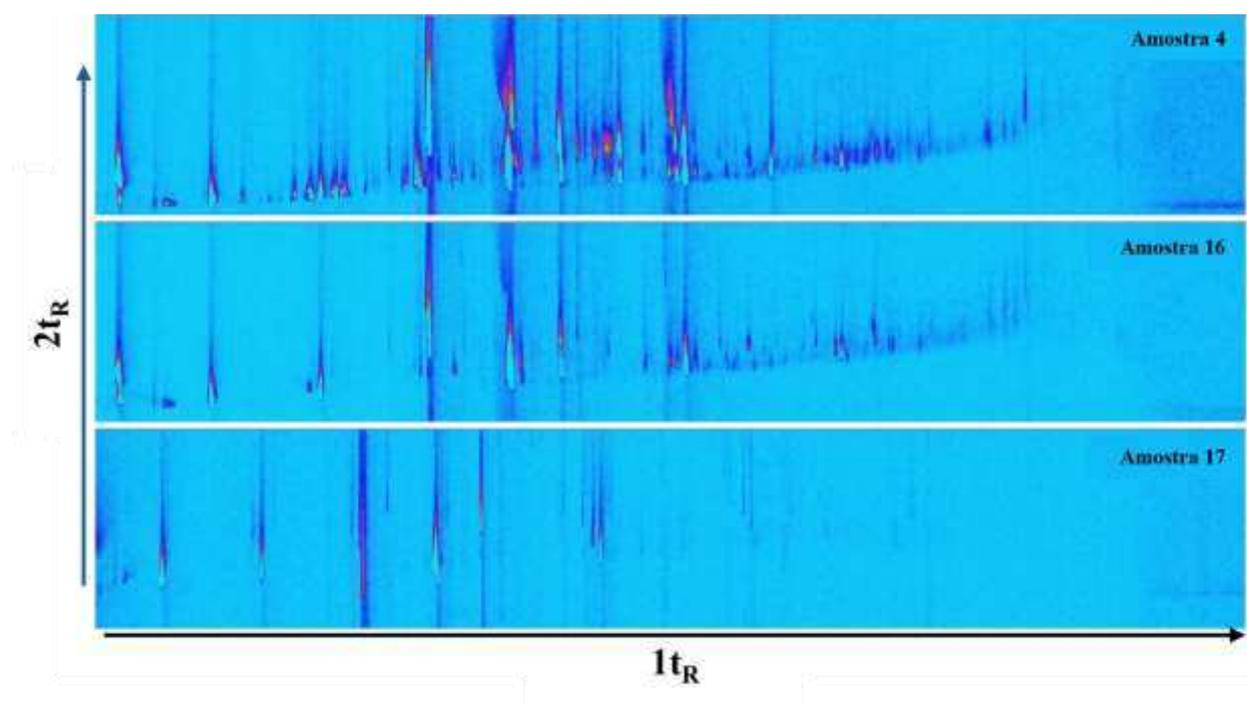


Figura 20: Cromatogramas obtidos através da técnica HS-SPME-GCxGC-MS para as amostras #4, #16 e #17, respectivamente classificadas como "forte", "média" e "fraca" para o amargor

com base na relação estabelecida por iPLS-DA, em concordância com ADQ para todos os atributos investigados.

A análise dos perfis cromatográficos das amostras foi correlacionada com as notas atribuídas sensorialmente por meio do iPLS-DA. Esse método selecionou os intervalos que melhor discriminam as classes de sabor do grão, sabor e aroma do Lúpulo e amargor para as categorias de forte e fraco²²⁹ Os resultados foram apresentados na Tabela 7 ²³⁶.

Tabela 7:Tamanho do Intervalo de variáveis Latentes para cada atributo e as suas respectivas variáveis latentes usadas para modelagem por iPLS-DA.

O processo de obtenção dos modelos de classificação para cada atributo sensorial é ilustrado no esquema apresentado na Figura 21.

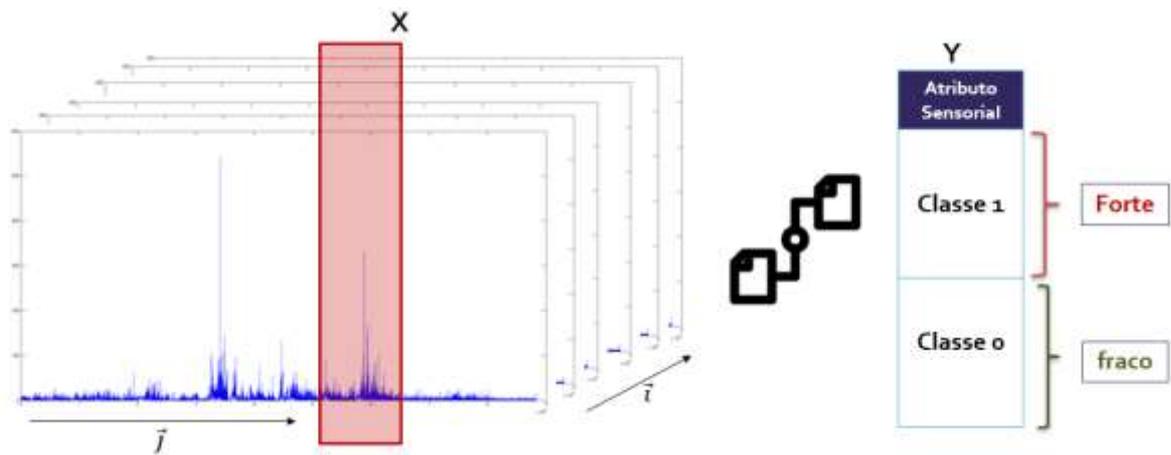


Figura 21: Esquema representativo dos dados de entrada para obtenção do modelo de classificação por iPLS-DA. A matriz de dados X foi formada a partir da organização dos cromatogramas bidimensionais em um arranjo ordenado de linhas e

Atributo	intervalo	VLs
Amargor	10000	4
Sabor do lúpulo	1000	3
Aroma do lúpulo	10000	3
Sabor do grão	1000	3

colunas. Cada replicata da amostra i foi associada ao respectivo vetor linha e cada coluna se referiu a uma variável j , intensidade. Assim, a matriz X ($i \times j$) foi criada com um total de 66 linhas e 88.245 colunas, proporcionando uma representação compacta dos dados.

Inicialmente, os dados foram pré-processados com o intuito de melhorar a qualidade dos sinais, reduzir interferências de ruído e eliminar variações nos tempos de retenção causadas por mudanças nas amostras e no equipamento. O primeiro pré-processamento consistiu na utilização do algoritmo *icoshift* para alinhar os dados brutos e corrigir os deslocamentos de tempo de retenção para o mesmo analito em diferentes amostras. Em seguida, foi realizada a correção da linha de base através do algoritmo *wlsbaseline* para corrigir distorções que geram variações na intensidade dos picos. Os dados foram então centralizados na média e normalizados pela maior intensidade, com um fator de normalização igual a um aplicado a cada sinal. Essa etapa de processamento tem como objetivo melhorar a relação entre os sinais dos compostos majoritários e minoritários²³⁷.

Após a etapa de pré-processamento, os dados foram divididos em conjuntos de calibração e validação pelo algoritmo Kennard-Stone (KS), no qual 2/3 dos dados foram destinados à calibração e 1/3 à validação, baseando-se na maior variabilidade amostral do conjunto original²³⁸.

Em seguida, o iPLS-DA foi aplicado ao conjunto de calibração para selecionar as variáveis relevantes. O modelo foi executado no modo forward, com a escolha automática do tamanho do passo do intervalo e do número de intervalos, como apresentado na Tabela 8. Os tamanhos dos intervalos e o número de variáveis latentes foram avaliados por meio do erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV), sendo o valor mínimo indicativo do número adequado de VLs para o modelo. Determinar o número adequado de variáveis latentes (VL) é uma etapa crucial na construção do modelo, pois um grande número de VL pode reduzir o desvio da reta de calibração, mas pode levar a um super ajuste do modelo.

Os cromatogramas bidimensionais das amostras com as pontuações mais altas e mais baixas para cada atributo sensorial avaliado foram utilizados na elaboração do modelo de discriminação, como demonstrado na Figura 22. Nessa figura, são destacados os intervalos das variáveis mais relevantes selecionados pelo algoritmo iPLS-DA.

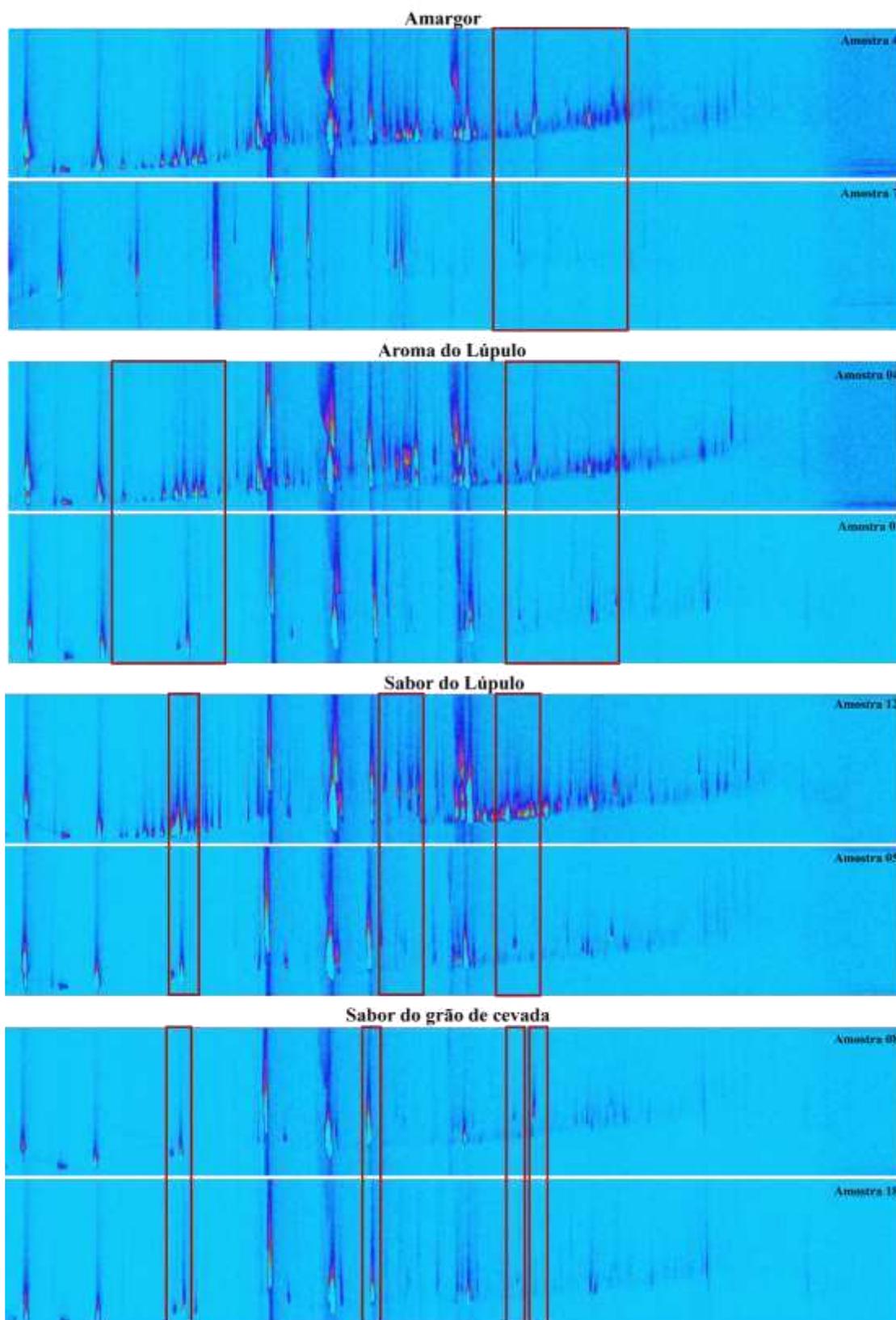


Figura 22: Cromatogramas bidimensionais exibem as regiões cruciais para a discriminação dos modelos, destacadas em vermelho. Essas áreas delimitadas representam os intervalos selecionados pelo modelo iPLS-DA para as maiores e menores pontuações de cada atributo sensorial avaliado.

Os intervalos representados na Figura 22 foram os responsáveis pela discriminação entre as classes forte e fraco, possibilitando a obtenção dos modelos de classificação para as amostras de cervejas. Os resultados obtidos a partir dos modelos de classificação são resumidos na “Matriz de Confusão” (Tabela 11), que apresenta o número de amostras com Verdadeiro Positivo (TP), Verdadeiro Negativo (TN), Falso Positivo (FP) e Falso Negativos (FN). A partir desses valores, foram calculados os parâmetros estatísticos de: Sensibilidade de classes (SENS), a especificidade de classe (SPEC) e a eficiência (EFF), para avaliar o desempenho dos modelos de classificação desenvolvidos. A Tabela 8 apresenta todos os parâmetros calculados com base na validação cruzada dos conjuntos de calibração e validação.

Tabela 8: Tabela com as figuras de méritos do modelo de classificação por iPLS-DA obtida para os atributos sensoriais avaliados para os conjuntos de Calibração (CAL) e Validação (VAL). SG= Sabor do Grão, SL= Sabor do Lúpulo, AL= Aroma do Lúpulo e AMG= amargor.

ATRIBUTOS		FIGURAS DE MÉRITO					
		SENS		SPEC		EFF	
		CAL	VAL	CAL	VAL	CAL	VAL
SG	FORTE	88	86	94	67	91	76
	FRACO	94	67	88	86	91	76
SL	FORTE	93	100	88	77	90	88
	FRACO	88	77	93	100	95	88
AL	FORTE	88	86	88	67	88	76
	FRACO	95	67	95	86	95	76
AMG	FORTE	93	100	94	71	93	84
	FRACO	94	71	93	100	93	84

A Sensibilidade (SENS) e a Especificidade (SPEC) são figuras de mérito usadas para avaliar os modelos de classificação. A sensibilidade está relacionada com a taxa de verdadeiro positivo, e é representada pela **Equação 1**.

$$SENS = \frac{(TP)}{(TP+FN)} \quad \text{Equação 1}$$

As sensibilidades alcançadas nos conjuntos de dados de calibração e validação dos atributos sensoriais avaliados foram maiores nos dados de calibração para os atributos fortes, com variações entre 86 % e 100 %.

Os valores da especificidade para os conjuntos de dados de calibração e validação foram calculados utilizando a **Equação 2**. Observou-se que, para os atributos sensoriais avaliados, o

melhor desempenho da especificidade foi para a classe dos "fracos", com valores variando entre 85 % e 100 %. A tabela 28 apresenta esses resultados.

$$SPEC = \frac{(TN)}{(FP+TN)} \quad \text{Equação 2}$$

A sensibilidade e a seletividade estão relacionadas com a assertividade do modelo em classificar as amostras de forma correta, correlacionando as regiões dos cromatogramas de maior relevância com a avaliação sensorial. Observa-se que os valores desses parâmetros são simétricos, ou seja, o valor SENS para a classe "forte" para os atributos sensoriais é igual ao valor SPEC obtido para a classe "fraco" para os atributos e vice-versa ²²⁹.

Foi constatado que todos os modelos de classificação desenvolvidos apresentaram uma capacidade satisfatória de previsão, com valores de eficiência acima de 75 %. A eficiência foi calculada utilizando dados de especificidade e sensibilidade e apresentada pela **Equação 3**.

$$EFF = \sqrt{(SPEC * SENS)} \quad \text{Equação 3}$$

A modelagem de classificação por iPLS-DA dos modelos foi considerada satisfatória, pois trabalhou-se com variabilidade amostral e com similaridade entre os perfis de compostos voláteis das amostras de cerveja quanto à amostragem obtida pela ADQ.

As Figuras 23 a 26 apresentam os resultados detalhados dos valores preditos de Y para a classe "forte" dos atributos sensoriais, sendo a Figura 23 referente ao sabor do grão, a Figura 24 ao sabor do lúpulo, a Figura 25 ao aroma do lúpulo e a Figura 26 ao amargor.

Durante a fase de treinamento, foi desenvolvida uma memória sensorial específica para avaliar o sabor do grão. Isso foi realizado fortificando as amostras com grãos moídos de cevada. Essa memória sensorial, assim adquirida, serviu como referência para os provadores ao atribuírem notas às diversas amostras de cerveja. O modelo de classificação obtido para essa avaliação é apresentado na Figura 23.

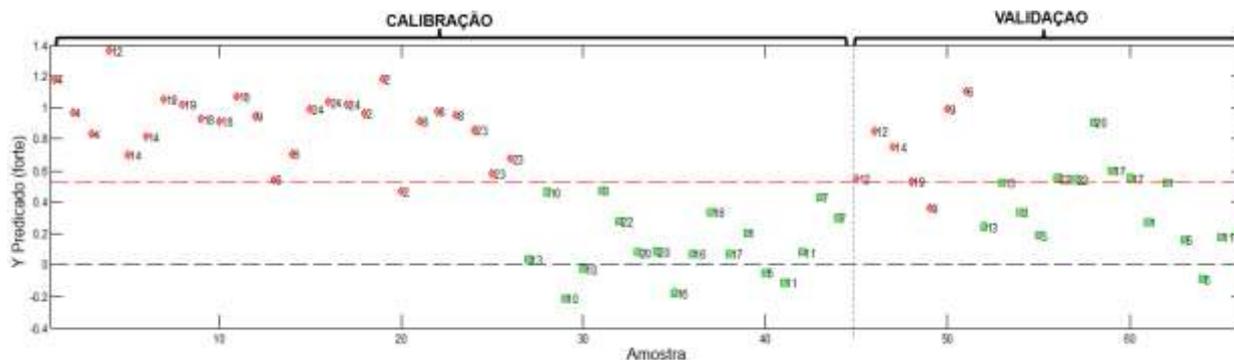


Figura 23: Resultado obtido pelo modelo iPLS-DA para a variável Y predita como "forte" do sabor do grão, a partir das 22 amostras analisadas em triplicata. A linha vermelha tracejada representa o limite entre as duas classes ("forte" e "fraco"), com um valor igual a 0,56. Os diamantes vermelhos indicam as amostras classificadas sensorialmente como "forte" e os quadrados verdes as amostras classificadas como "fraco".

Através da utilização do iPLS-DA para modelagem, foi possível obter uma boa capacidade discriminatória entre as amostras com base na análise sensorial e no perfil de compostos voláteis. Este modelo possibilitou a identificação de uma região específica nos cromatogramas (ver Figura22), a qual apresenta compostos que estão relacionados com a percepção sensorial do sabor do grão, conforme ilustrado na Figura 23. No entanto, algumas amostras foram discriminadas erroneamente, possivelmente devido a fatores como efeito amostral e percepção sensorial individual dos provadores. A região selecionada nos cromatogramas está correlacionada com a origem dos ingredientes do malte, conforme definido pela Lei nº 8.918 de 14 de julho de 1994. Essa legislação especifica os cereais que podem ser adicionados à cerveja, como cevada, trigo, arroz, milho, centeio, aveia e sorgo, além de estabelecer proporções para o malte de cevada em diferentes tipos de cerveja.

Para aprimorar a memória sensorial do sabor do Lúpulo, a equipe de provadores foi treinada com o padrão de lúpulo Saaz, o qual é comumente utilizado na produção de cervejas Lager. Além disso, eles foram orientados a avaliar sensorialmente o Lúpulo, considerando as notas florais, frutadas e a sensação de amargor. Eles foram orientados a avaliar sensorialmente as notas florais, frutadas e a sensação de amargor do lúpulo, e essas notas foram utilizadas para a modelagem por iPLS-DA em correlação com os *fingerprints* das amostras. Uma região específica nos cromatogramas das amostras foi escolhida, a qual apresentou correlação com as notas sensoriais atribuídas pelos provadores. Essa região contém potenciais marcadores que podem ser empregados para identificar o tipo de lúpulo utilizado, considerando que os fabricantes geralmente não divulgam essa informação. Embora a correlação entre o tipo de

lúpulo utilizado e o cromatograma seja complexa e possa ser afetada por várias variáveis durante o processo de produção da cerveja, o HS-SPME-GC×GC foi capaz de detectar as principais discrepâncias nas intensidades do sabor e aroma do lúpulo. Notavelmente, essas diferenças foram observadas nos compostos minoritários. No entanto, algumas amostras foram incorretamente discriminadas pelo modelo. É importante destacar que a ADQ não foi usada para determinar as diferentes notas de sabor de lúpulo originadas de diferentes tipos. Além disso, a análise cromatográfica fornece um perfil volátil dos ingredientes contidos nas amostras, o que pode ter sido um dos motivos para a classificação incorreta de algumas amostras ao correlacionar as variáveis de maior importância para esse atributo e a avaliação sensorial dele. A Figura 24 ilustra a modelagem por iPLS-DA.

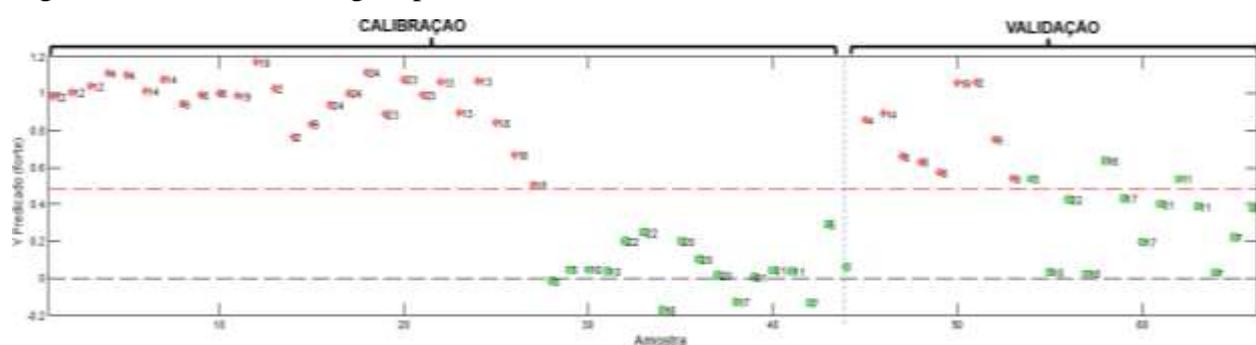


Figura 24: Resultado obtido pelo modelo iPLS-DA para a variável Y predita como "forte" do sabor do lúpulo, a partir das 22 amostras analisadas em triplicata. A linha vermelha tracejada representa o limite entre as duas classes ("forte" e "fraco"), com um valor igual a 0,48. Os diamantes vermelhos indicam as amostras classificadas sensorialmente como "forte" e os quadrados verdes as amostras classificadas como "fraco".

O aroma do lúpulo Saaz foi avaliado em termos de notas floral e/ou herbal. Os provadores foram expostos ao aroma de amostras contendo lúpulo Saaz, o que gerou a memória olfativa e foi acionado quando avaliaram as amostras. O modelo de classificação ilustrado na Figura 25 para este atributo identificou algumas amostras classificadas incorretamente. Como mencionado anteriormente para o sabor do lúpulo, o mesmo comportamento foi observado para o aroma do lúpulo.

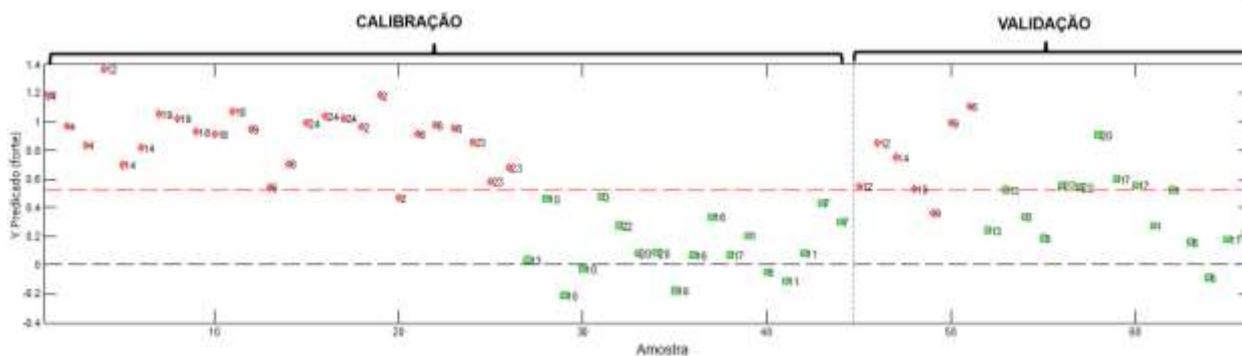


Figura 25: Resultado obtido pelo modelo iPLS-DA para a variável Y predita como "forte" do aroma do lúpulo, a partir das 22 amostras analisadas em triplicata. A linha vermelha tracejada representa o limite entre as duas classes ("forte" e "fraco"), com um valor igual a 0,53. Os diamantes vermelhos indicam as amostras classificadas sensorialmente como "forte" e os quadrados verdes as amostras classificadas como "fraco".

Na Figura 26, são apresentados os resultados de um modelo de estudo sobre o amargor, que mostrou boa precisão na discriminação das amostras, correlacionando as regiões selecionadas nos cromatogramas com as notas atribuídas sensorialmente. No entanto, no modelo obtido, algumas amostras foram classificadas incorretamente, e isso pode estar relacionado a uma memória residual das papilas gustativas das amostras mais amargas, afetando a classificação de cervejas com baixo amargor. O modelo iPLS-DA para o amargor indicou que a percepção sensorial desse atributo não está relacionada apenas à presença de iso- α -ácidos, mas também à presença de compostos de outras funções orgânicas, como ésteres, álcoois, éteres e ácidos carboxílicos. Portanto, pode-se afirmar que a percepção sensorial do amargor é influenciada pela duração do estímulo e está diretamente relacionada aos ingredientes utilizados na produção, como o grau de torrefação do malte, o tipo de malte, a fervura, o lúpulo adicionado e a levedura.

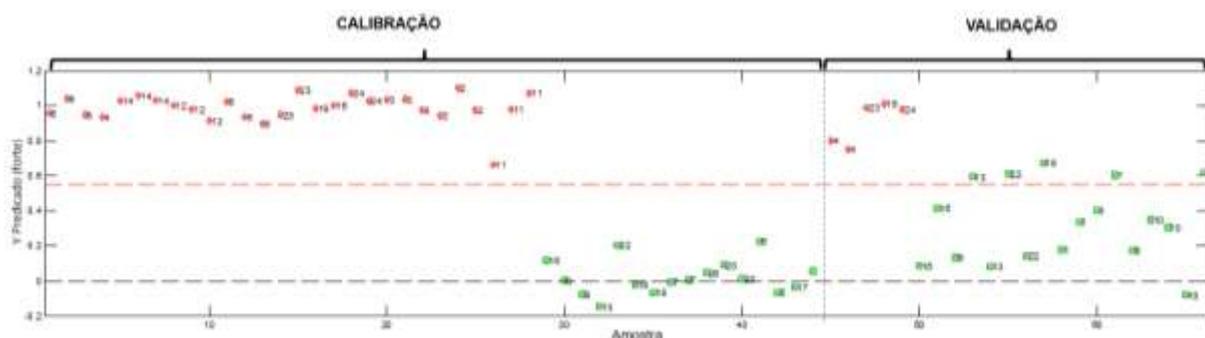


Figura 26: Resultado obtido pelo modelo iPLS-DA para a variável Y predita como "forte" do sabor amargo, a partir das 22 amostras analisadas em triplicata. A linha vermelha tracejada representa o limite entre as duas classes ("forte" e "fraco"), com um valor igual a 0,55. Os

diamantes vermelhos indicam as amostras classificadas sensorialmente como "forte" e os quadrados verdes as amostras classificadas como "fraco".

Os modelos de discriminação apresentam uma boa capacidade discriminativa entre as classes forte e fraco para cada atributo sensorial avaliado, porém a diferença entre os valores de limiar discriminantes ajustados para calibração e validação pode ser atribuída à discrepância entre o julgamento dos provadores e a avaliação realizada pela ferramenta para cada amostra (ver Tabela 7). Dessa forma, algumas amostras foram classificadas erroneamente em uma das duas classes, enquanto outras caíram na faixa de incerteza fisiológica relacionada ao paladar.

Para uma melhor compreensão do modelo iPLS-DA, foi realizada a análise das Variáveis Latentes, que identificaram os possíveis compostos marcadores dos atributos sensoriais avaliados.

3.4 Potenciais Marcadores

Identificar os principais determinantes metabólitos associados às características peculiares como sabor do grão, sabor e aroma do lúpulo e amargor das cervejas está intimamente associada a aceitação do consumidor. Esses metabólitos desempenham papel importante na caracterização das cervejas, em que são identificados grupos de metabólitos quimicamente caracterizados e que sinalizam diversas atribuições sensoriais das cervejas.²³⁹

Atualmente, na comunidade científica, são empregadas diversas estratégias analíticas para o estudo da Metabolômica não direcionada. Essas estratégias visam realizar uma análise abrangente de todos os analitos mensuráveis, incluindo incógnitas químicas, de forma a obter uma cobertura Metabolômica ideal⁸⁹.

Esses estudos proporcionam conjuntos de dados, os quais são utilizados para explorar novos recursos ou caracterizar diferenças entre amostras. Para isso, são empregadas técnicas de bioestatística, bioquímica e informática para a mineração e interpretação desses dados.²³⁹

Através da abordagem de perfil metabólico não direcionado, é possível realizar diversas identificações e avaliações nas cervejas²⁴⁰, como a análise do envelhecimento⁸⁹,²⁴¹ a investigação das condições de armazenamento²⁴², a análise das características de cor²⁴³, a avaliação da diversidade do lúpulo²⁴⁴, o estudo das características da cevada²⁴⁵ e a identificação de diferentes espécies de leveduras²⁴⁶.

Certos compostos metabólicos podem sinalizar o envelhecimento das cervejas, incluindo aldeídos, ésteres de ácidos graxos e álcoois superiores. Esses compostos se desenvolvem durante a fermentação e o amadurecimento da cerveja e, ao longo do tempo, podem sofrer mudanças que impactam seu sabor, aroma e estabilidade. Por exemplo, o acetaldeído, gerado durante a fermentação, pode, em excesso, conferir notas indesejáveis, como o sabor de maçã verde. Da mesma forma, os ésteres de ácidos graxos, como o acetato de etila, podem adicionar aromas frutados, mas em quantidades elevadas, podem resultar em sabores desequilibrados. Os álcoois superiores, como o álcool isoamílico, também podem aumentar com o tempo, influenciando a percepção do aroma e sabor da cerveja ⁸⁹.

As condições de armazenamento das cervejas podem influenciar a formação e a evolução de compostos como aldeídos, ácidos orgânicos, ésteres de ácidos graxos e produtos de degradação de lúpulo. Esses elementos surgem durante a fermentação e maturação da cerveja, podendo ser modificados durante o armazenamento, especialmente se as condições não forem ideais. Por exemplo, altos níveis de aldeídos, como o acetaldeído, podem indicar a oxidação da cerveja devido à exposição ao ar durante o armazenamento. Ácidos orgânicos, como o ácido láctico e o ácido acético, podem aumentar em cervejas mal conservadas, resultando em sabores azedos indesejados. Os ésteres de ácidos graxos, responsáveis pelos aromas frutados, podem diminuir com o tempo devido à degradação, afetando a complexidade sensorial da cerveja. Adicionalmente, produtos de degradação de lúpulo podem aumentar com o tempo de armazenamento, resultando em sabores amargos ou herbáceos mais acentuados ²⁴².

Para identificar a diversidade do lúpulo, são considerados terpenos como o humuleno, o mirceno, o β -cariofileno e o α -humuleno. Esses componentes são responsáveis pelos aromas distintos do lúpulo e variam de acordo com a variedade utilizada na produção da cerveja. Por exemplo, diferentes tipos de lúpulo podem apresentar perfis únicos de terpenos, resultando em aromas que vão desde cítricos e florais até resinosos e picantes. Além dos terpenos, outros compostos, como ésteres de ácidos graxos e aldeídos, também podem contribuir para a diversidade sensorial do lúpulo e, por consequência, da cerveja ²⁴⁴.

A identificação das diversas espécies de leveduras pode ser conduzida com base em uma ampla variedade de compostos metabólicos específicos que elas geram durante o processo de fermentação. Esses compostos incluem álcoois superiores, como isobutanol, isoamílico e 2-feniletanol, que contribuem para os aromas frutados e florais da cerveja. Os ésteres, como acetato de etila, acetato de isoamila e acetato de 2-feniletila, conferem aromas frutados e florais distintos à cerveja. Além disso, ácidos orgânicos como ácido acético e ácido láctico, que variam

entre diferentes cepas de leveduras, podem impactar o perfil sensorial da cerveja. Aldeídos, como acetaldeído, podem adicionar notas verdes e de maçã à cerveja, enquanto compostos de enxofre, como sulfeto de hidrogênio e dimetil sulfeto (DMS), produzidos por algumas cepas de levedura, podem influenciar o aroma. Além disso, compostos voláteis secundários, como terpenos e fenóis, produzidos em diferentes proporções por várias espécies de leveduras, podem afetar o perfil aromático geral da cerveja ²⁴⁶.

Até o momento, não temos conhecimento de investigações anteriores que tenham explorado uma correlação direta entre a percepção sensorial dos atributos de amargor, sabor do grão, sabor e aroma do lúpulo (para intensidades tanto "forte" quanto "fraco") com HS-SPME-GC×GC e com os padrões metabólicos dos compostos voláteis presentes nas matérias-primas da cerveja, usando a análise discriminante iPLS-DA.

Para uma compreensão mais profunda do modelo de classificação, realizou-se uma análise das Variáveis Latentes. Essas variáveis destacaram quais compostos possuem potencial para atuar como marcadores dos atributos sensoriais avaliados. Diferentes compostos foram identificados para cada atributo sensorial, e esses estão apresentados de forma detalhada na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados do modelo PLS-DA aplicados a amostras de cervejas descritas como forte e fraco para cada característica sensorial. (Continua)

Classificação	Composto	Características Sensoriais	Fórmula	LTPRI
Ácido graxo	ácido caprílico	gorduroso, ceroso, rançoso, oleoso, vegetal, queijo	C ₈ H ₁₆ O ₂	1210
	álcool amílico	Pungente, fermentado, pão fermentado, fúsel	C ₅ H ₁₂ O	806
Álcoois superiores	2-Metil-1-butanol	Maltado, balsâmico, vinho, cebola madura	C ₅ H ₁₂ O	806
	Álcool Feniletílico	Mel, picante, ervas, rosa	C ₈ H ₁₀ O	1128
Ésteres	Acetato de 2-metilbutila	Herbáceo, semelhante a rum, odor frutado e fermentado, banana.	C ₇ H ₁₄ O ₂	902
	acetato de pentila	Doce, frutado, Pêra, banana madura	C ₇ H ₁₄ O ₂	905
	Caproato de etila	Doce, abacaxi, frutado, banana verde,	C ₈ H ₁₆ O ₂	1020

Tabela 9: Resultados do modelo PLS-DA aplicados a amostras de cervejas descritas como forte e fraco para cada característica sensorial. (Conclusão)

	formato de fenetila	Verde, agrião, banana verde, fenólico	$C_9H_{10}O_2$	1132
	octanoato de etila	Ceroso, doce, bolorento, abacaxi e frutado	$C_{10}H_{20}O_2$	1214
	Fenilacetato de metilas	Doce, floral, frutado, mel e picante	$C_{10}H_{12}O_2$	1225
	Acetato de 2-feniletila	Doce, mel, floral rosado, com leve nota de mel fermentado, nuances de cacau e balsâmico	$C_{10}H_{12}O_2$	1270
	9-Decenoato de etila	frutado	$C_{12}H_{22}O_2$	1411
	Decanoato de etila	Doce, ceroso, frutado, maçã	$C_{12}H_{24}O_2$	1411
	Dodecanoato de etila	Fruta, floral, gorduroso	$C_{14}H_{28}O_2$	1605
Sesquiterpeno	Mirceno	Picante, amadeirado, cítrico, frutado e mentolado	$C_{10}H_{16}$	1004
	Humuleno	Amadeirado e picante	$C_{15}H_{26}O$	1474
	Guaiene	Amadeirado, doce e picante	$C_{15}H_{24}$	1479
	α -Acorenol	Frutado, doce e floral.	$C_{15}H_{26}O$	1502
	a-Calacorene	Amadeirado	$C_{15}H_{20}$	1668

A análise dos compostos aromáticos que mais influenciam nas características sensoriais das cervejas é comumente realizada por meio das técnicas de cromatografia gasosa em combinação com HS-SPME, as quais têm uma ampla aplicação.^{11,57,64,194,195,247-252}

Entretanto, visando evitar a atribuição incorreta, foram determinados os índices de retenção através de uma programação linear de temperatura para todos os compostos listados na Tabela 10. Os valores calculados de LTPRI para os compostos mencionados na Tabela 10 demonstraram uma discrepância de unidades aceitáveis ($\Delta \leq 30$) quando comparados aos valores de referência experimentais. Essa discrepância pode ser plausivelmente atribuída ao sistema de detecção empregado na cromatografia bidimensional abrangente, onde o sistema de espectrometria de massas por quadrupolo (QMS) desempenha um papel nas aparentes diferenças

nas larguras dos picos, devido aos efeitos da taxa de varredura (com varredura lenta proporcional ao alargamento dos picos) ²⁵³. Nesse cenário, constatou-se que todos esses compostos recebem classificação como substâncias responsáveis por influenciar o aroma e o sabor. Essa categorização é respaldada por instituições dedicadas à análise quantitativa de metabólitos e à validação de biomarcadores, a exemplo da TMIC (The Metabolomics Innovation Centre, em português, Centro de Inovação em Metabolômica).²⁵⁴ e TGSC (The Good Scents Company, em português, a empresa de bons aromas)²⁵⁵.

A avaliação sensorial está sujeita a diversos elementos que impactam a Alta Qualidade Descritiva (ADQ), tais como a maneira como as amostras são apresentadas aos avaliadores, a eficácia da memória sensorial durante o treinamento e as particularidades fisiológicas dos órgãos sensoriais de cada avaliador no momento da análise descritiva. A conexão entre a composição química dos perfis de compostos voláteis presentes nas amostras de cerveja, determinados por meio da cromatografia do perfil volátil, e os componentes químicos que podem atuar como indicadores potenciais das características sensoriais, foi avaliada com base no conjunto de variáveis latentes derivadas de cada modelo de classificação.

Os compostos que possuem potencial para servir como indicadores do aroma proveniente do lúpulo e ao amargor e desempenham um papel significativo na diferenciação dos sabores atribuídos ao lúpulo são identificados como pertencentes à classe dos álcoois superiores, como o álcool fenético, e aos terpenos, incluindo o Mirceno, o Humuleno, o α -Calacorene e o Guaiene. O Mirceno é o composto encontrado predominantemente na maioria das variedades de lúpulo. Ele apresenta um aroma distintivo de "lúpulo fresco" e é frequentemente descrito como sendo verde, fresco, balsâmico²⁵⁶⁻²⁵⁸. O humuleno é outro composto encontrado em grande concentração nos lúpulos, e adiciona notas aromáticas como picantes, amadeiradas e herbais, conhecidas pelos cervejeiros como características distintivas dos lúpulos nobres ^{225,257-259}. Além disso, dois compostos já consolidados como marcadores potenciais desse sabor se destacam: o β -Mirceno e o Humuleno. O β -Mirceno, um terpeno encontrado em plantas da mesma família do lúpulo, contribui com notas cítricas e uma certa amargura ^{260,261}. Por sua vez, o humuleno, um Sesquiterpeno natural do lúpulo, também é responsável por sabores herbais e picantes²⁶².

O α -Calacorene confere notas amadeiradas, o Guaiene oferece notas doces, amadeiradas e picantes, enquanto o álcool fenético oferece notas de rosas e mel. Todos esses compostos são classificados como contribuintes adicionais para o aroma floral e agradável ²⁶³.

Os compostos pertencentes a classe dos ésteres e aldeídos, são considerados possíveis indicadores do sabor proveniente do grão e levedura. A natureza do sabor do grão pode estar correlacionada à presença de compostos de sabor doce, como o acetato de β -fenetila, que pode ser um biomarcador potencial da existência de compostos fornecedores de açúcar nas cervejas²⁵⁴. O acetato de vanilila é um possível indicador do grau de torrefação do malte, devido à sua presença em grãos de cacau, que exibem aromas similares aos da torrefação de cereais²⁵⁴. O hexadecanoato de etila é um composto derivado da rota metabólica das leveduras, e sua concentração pode estar correlacionada com os açúcares fermentáveis presentes no mosto. Portanto, ele pode ser considerado um potencial marcador da qualidade do amido dos grãos utilizados na produção da cerveja²⁶⁴.

Todos os modelos de classificação calculados para distinguir entre amostras de intensidade forte e fraca em relação às características sensoriais demonstraram resultados altamente congruentes com o conhecimento presente na literatura^{37,52,191,265-269}. Esses modelos de classificação apresentaram sensibilidade, seletividade e eficácia satisfatórias.

Os resultados obtidos têm o potencial de oferecer insights valiosos sobre as distintas assinaturas metabólicas das matérias-primas, que contribuem diretamente para a intensidade dos atributos avaliados neste estudo. Além disso, esses resultados podem revelar nuances nas composições dos ingredientes ou nos teores desses ingredientes entre diferentes variantes, permitindo identificar as bases materiais subjacentes às variações metabólicas observadas²⁴⁶.

Adicionalmente, a análise dos padrões metabólicos dos compostos voláteis presentes nas matérias-primas pode contribuir para a criação de uma plataforma tecnológica de controle de qualidade, destinada a caracterizar e diferenciar a autenticidade dos ingredientes utilizados. Essa abordagem ganharia relevância, especialmente ao considerar que as metodologias tradicionais de análise sensorial, que envolvem etapas de treinamento, seleção e avaliação por meio de um grupo de avaliadores, podem ser onerosas e demandar tempo tanto para os analistas quanto para os avaliadores.

4.0 CONCLUSÃO

A determinação das origens distintas dos variados aromas e sabores encontrados nas cervejas produzidas atualmente no Brasil tem se tornado uma área de pesquisa crescentemente explorada. Recentemente, surgiu a proposta de identificar compostos voláteis específicos que possam estar associados à análise sensorial dos aromas e sabores cervejeiros. As amostras de

cerveja Lager industrializadas no Brasil são conhecidas por apresentar um perfil mais adocicado, com descrições sensoriais de lúpulo, amargor e cevada de intensidade moderada. No âmbito deste estudo, a extração e identificação dos compostos voláteis das cervejas foi realizada utilizando HS-SPME-GC×GC-MS, uma ferramenta de alta resolução de pico que possibilitou a obtenção dos *fingerprintss* para cada amostra de cerveja, comparáveis à análise sensorial descritiva quantitativa (ADQ).

A análise sensorial serviu tanto para classificar as amostras de cervejas quanto para estabelecer padrões de referência para definir os limites de percepção dos atributos como "forte" e "fraco". Simultaneamente, exploramos os dados cromatográficos provenientes da abordagem HS-SPME-GC×GC-MS utilizando técnicas quimiométrica e baseando-nos na análise sensorial. Dessa forma, foi desenvolvido um modelo capaz de diferenciar as amostras de cervejas com base nos atributos avaliados sensorialmente. Esses atributos estão intimamente relacionados com a composição química do perfil aromático, que, por sua vez, reflete os ingredientes utilizados e a técnica de produção empregada. Além disso, por meio do modelo iPLS-DA, conseguiu-se identificar classes específicas de compostos que caracterizam as discrepâncias entre as intensidades "forte" e "fraco", o que ressalta a utilidade deste estudo, por exemplo, na avaliação da autenticidade e veracidade dos ingredientes mencionados nos rótulos.

CAPÍTULO 4

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS e APÊNDICE

REFERÊNCIAS

1. Oliver, G.; Mendes, I.; Filho, W. G. V. *O guia Oxford da cerveja* ; 2020 Editora Edgard Blücher Ltda ., Ed.; 5th ed.; 2009: São Paulo, 2020; Vol. 1.
2. Lin, M.; Yang, B.; Dai, M.; Xu, Y.; Li, X.; Sun, B. East meets west in alcoholic beverages: Flavor comparison, microbial metabolism and health effects. *Food Biosci* **2023**, *56*.
3. Habschied, K.; Košir, I. J.; Krstanović, V.; Kumrić, G.; Mastanjević, K. Beer polyphenols—bitterness, astringency, and off-flavors. *Beverages* **2021**, *7*.
4. Vanderhaegen, B.; Delvaux, F.; Daenen, L.; Verachtert, H.; Delvaux, F. R. ;*Food Chem* **2007**, *103*, 404.

5. Dempsey, S.; Hall, M.; Schramm, K.; Major, T.; Casselman, S.; Dawson, T.; Garofalo, P.; Gros, B.; Hall, B.; Houseman, D.; Kor-, A.; Lodahl, M.; Pepin, C. **2008**.
6. Charmet, G.; Pin, P. A.; Schmitt, M.; Leroy, N.; Claustres, B.; Burt, C.; Genty, A. ;*Euphytica* **2023**, 219.
7. Guido, L. F.; Ferreira, I. M. The Role of Malt on Beer Flavour Stability. *Fermentation* **2023**, 9.
8. Salamon, A.; Kowalska, H.; Ignaczak, A.; Marzec, A.; Kowalska, J.; Szafrńska, A. ;*Foods* **2023**, 12.
9. Prado, R.; Gastl, M.; Becker, T. ;*Food Chem* **2023**, 424.
10. Ross, A. S.; Meints, B. M.; Bunting, J. S. In *ICC Handbook of 21st Century Cereal Science and Technology*; Elsevier, 2023; pp. 153–160.
11. Dong, L.; Hou, Y.; Li, F.; Piao, Y.; Zhang, X.; Zhang, X.; Li, C.; Zhao, C. ;*J Sci Food Agric* **2015**, 95, 915.
12. Salimbeni, J. F.; Pereira, M.; Meneguetti, D. R. R. D. *UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO ENGENHARIA QUÍMICA CARACTERIZAÇÃO DA ÁGUA E SUA INFLUÊNCIA SENSORIAL PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL*; 2016.
13. Rosa, N. A.; Afonso, J. C. ;*Química Nova na Escola* **2015**, 37.
14. Aline Muniz de Oliveira Belo Horizonte, N. *UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS-UFMG INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS-ICB PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA ESPECIALIZAÇÃO EM MICROBIOLOGIA Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja*; 2011.
15. D. Junior, A. A.; Vieira, A. G.; Ferreira, T. P. ;*Revista Processos Químicos* **2009**, 3, 61.
16. *UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO MESTRADO EM ENGENHARIA DE PRODUÇÃO LUCIANO MORO TOZETTO PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL ADICIONADA DE GENGIBRE (Zingiber officinale)*.
17. Hagemann, M. H.; Rigling, M.; Mannweiler, S.; Born, U.; Sprich, E.; Milyaev, A.; Zhang, Y. ;*Food Research International* **2024**, 175.
18. Hagemann, M. H.; Rigling, M.; Mannweiler, S.; Born, U.; Sprich, E.; Milyaev, A.; Zhang, Y. ;*Food Research International* **2024**, 175.
19. Paguet, A. S.; Siah, A.; Lefèvre, G.; Vandenberghe, M.; Lutun, D.; Degardin, N.; Samaillie, J.; Mathiron, D.; Dermont, C.; Michels, F.; Fauconnier, M. L.; Chollet, S.; Molinié, R.; Fontaine, J. X.; Sahpaz, S.; Rivière, C. ;*Food Chem* **2024**, 433.
20. Gent, D. H.; Block, M.; Massie, S. T.; Phillips, C. L.; Richardson, B. J.; Shellhammer, T. H.; Trippe, K. M.; Wiseman, M. S. ;*Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2023**.
21. Roberts, R.; Khomenko, I.; Eyres, G. T.; Bremer, P.; Silcock, P.; Betta, E.; Biasioli, F. ;*Journal of Mass Spectrometry* **2023**, 58.
22. Jiang, L.; Song, J.; Qi, M.; Cao, Y.; Li, Y.; Xu, M.; Li, L.; Zhang, D.; Wang, C.; Li, H. ;*Appl Microbiol Biotechnol* **2023**, 107, 6937.

23. Roberts, R.; Khomenko, I.; Eyres, G. T.; Bremer, P.; Silcock, P.; Betta, E.; Biasioli, F. ;*Journal of Mass Spectrometry* **2023**, 58.
24. Jiang, L.; Song, J.; Qi, M.; Cao, Y.; Li, Y.; Xu, M.; Li, L.; Zhang, D.; Wang, C.; Li, H. ;*Appl Microbiol Biotechnol* **2023**, 107, 6937.
25. Paszkot, J.; Gasiński, A.; Kawa-Rygielska, J. ;*Sci Rep* **2023**, 13.
26. Tocci, N.; Riccio, G. M.; Ramu Ganesan, A.; Hoellrigl, P.; Robatscher, P.; Conterno, L. ;*Beverages* **2023**, 9.
27. Maia, C.; Cunha, S.; Debyser, W.; Cook, D. ;*Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2023**, 81, 54.
28. Mathias, T. R. D. S.; Menezes, L. M.; Sérvulo, E. F. C. ;*Beverages* **2019**, 5.
29. Anju; Bhushan, K.; Kocher, G. S. ;*Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2023**.
30. Cela, N.; Galgano, F.; Perretti, G.; Di Cairano, M.; Tolve, R.; Condelli, N. ;*Food Chem* **2022**, 384.
31. Díaz, A. B.; Durán-Guerrero, E.; Lasanta, C.; Castro, R. From the Raw Materials to the Bottled Product: Influence of the Entire Production Process on the Organoleptic Profile of Industrial Beers. *Foods* **2022**, 11.
32. Benacchio, A.; Padilha, J. C.; Arrieche, L. da S. ;*CONTRIBUCIONES A LAS CIENCIAS SOCIALES* **2023**, 16, 15440.
33. Bamforth, C. W.; Fox, G. P. In *ICC Handbook of 21st Century Cereal Science and Technology*; Elsevier, 2023; pp. 363–368.
34. Yin Tan, W.; Li, M.; Devkota, L.; Attenborough, E.; Dhital, S. Mashing performance as a function of malt particle size in beer production. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2023**, 63, 5372–5387.
35. Nemenyi, J.; Pitts, E. R.; Martin-Ryals, A.; Boz, Z.; Zhang, B.; Jia, Z.; Budner, D.; MacIntosh, A. J.; Thompson-Witrick, K. A. ;*J Food Sci* **2023**.
36. Bamforth, C. W.; Fox, G. P. In *ICC Handbook of 21st Century Cereal Science and Technology*; Elsevier, 2023; pp. 363–368.
37. Gonzalez Viejo, C.; Fuentes, S.; Godbole, A.; Widdicombe, B.; Unnithan, R. R. ;*Sens Actuators B Chem* **2020**, 308, 127688.
38. de Oliveira, L. F.; Braga, S. C. G. N.; Augusto, F.; Poppi, R. J. ;*Brazilian Journal of Analytical Chemistry* **2021**, 8, 131.
39. Gonzalez Viejo, C.; Fuentes, S.; Howell, K.; Torrico, D. D.; Dunshea, F. R. ;*Physiol Behav* **2019**, 200, 139.
40. Humia, B. V.; Santos, K. S.; Barbosa, A. M.; Sawata, M.; Mendonça, M. da C.; Padilha, F. F. ;*Molecules* **2019**, 24.
41. Bettenhausen, H. M.; Benson, A.; Fisk, S.; Herb, D.; Hernandez, J.; Lim, J.; Queisser, S. H.; Shellhammer, T. H.; Vega, V.; Yao, L.; Heuberger, A. L.; Hayes, P. M. ;*Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2020**, 0, 1.

42. Humia, B. V.; Santos, K. S.; Schneider, J. K.; Leal, I. L.; de Abreu Barreto, G.; Batista, T.; Machado, B. A. S.; Druzian, J. I.; Krause, L. C.; da Costa Mendonça, M.; Padilha, F. F. ;*Food Chem* **2020**, *312*, 126087.
43. Castro, L. F.; Ross, C. F. ;*Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2018**, *76*, 86.
44. Elgaard, L.; Jensen, S.; Mielby, L. A.; Byrne, D. V. ;*J Sens Stud* **2019**, *34*, 1.
45. Nora, F. M. D. *Análise Sensorial Clássica: Fundamentos e Métodos*; Mérida Publishers, 2021.
46. *Descriptive Analysis in Sensory Evaluation*.
47. Callejón, R. M.; Ubeda, C.; Ríos-Reina, R.; Morales, M. L.; Troncoso, A. M. ;*J Chromatogr A* **2016**, *1428*, 72.
48. Oladokun, O.; Tarrega, A.; James, S.; Smart, K.; Hort, J.; Cook, D. ;*Food Chem* **2016**, *205*, 212.
49. STONE, H.; SIDEL, J. L. *SENSORY EVALUATION PRACTICES*; 3rd ed.; PRESS, CALIFORNIA ACADEMIC: SAN DIEGO, 2004.
50. Peña-Gómez, N.; Ruiz-Rico, M.; Pérez-Esteve, É.; Fernández-Segovia, I.; Barat, J. M.; Humia, B. V.; Santos, K. S.; Schneider, J. K.; Leal, I. L.; de Abreu Barreto, G.; Batista, T.; Machado, B. A. S.; Druzian, J. I.; Krause, L. C.; da Costa Mendonça, M.; Padilha, F. F.; Fulgêncio, A. C. C.; Araújo, V. P. T.; Pereira, H. V.; Botelho, B. G.; Sena, M. M.; Elgaard, L.; Jensen, S.; Mielby, L. A.; Byrne, D. V.; Eaton, C.; Chaya, C.; Smart, K. A.; Hort, J.; Gonzalez Viejo, C.; Fuentes, S.; Godbole, A.; Widdicombe, B.; Unnithan, R. R.; da Silva, G. A. ;*J Sens Stud* **2020**, *34*, 1.
51. Bettenhausen, H. M.; Benson, A.; Fisk, S.; Herb, D.; Hernandez, J.; Lim, J.; Queisser, S. H.; Shellhammer, T. H.; Vega, V.; Yao, L.; Heuberger, A. L.; Hayes, P. M. ;*Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2020**.
52. da Costa Jardim, C.; de Souza, D.; Machado, I. C. K.; Pinto, L. M. N.; de Souza Ramos, R. C.; Garavaglia, J. ;*Beverages* **2018**, *4*.
53. Díaz, A. B.; Durán-Guerrero, E.; Lasanta, C.; Castro, R. From the Raw Materials to the Bottled Product: Influence of the Entire Production Process on the Organoleptic Profile of Industrial Beers. *Foods* **2022**, *11*.
54. de la Cerda Garcia-Caro, R.; Thompson, G.; Zhang, P.; Hokamp, K.; Roche, F.; Carlin, S.; Vrhovsek, U.; Bond, U. ;*Yeast* **2022**, *39*, 535.
55. Pires, E. J.; Teixeira, J. A.; Brányik, T.; Vicente, A. A. Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **2014**, *98*, 1937–1949.
56. Liu, Z.; Wang, L.; Liu, Y. ;*J Sci Food Agric* **2018**.
57. Hege, M.; Jung, F.; Sellmann, C.; Jin, C.; Ziegenhardt, D.; Hellerbrand, C.; Bergheim, I. ;*Nutrition* **2018**, *45*, 68.
58. Su, X.; Yin, Y. ;*Food Chem* **2021**, *364*, 130410.
59. Tranchida, P. Q.; Maimone, M.; Purcaro, G.; Dugo, P.; Mondello, L. ;*TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *71*, 74.

60. Teo, C. C.; Chong, W. P. K.; Tan, E.; Basri, N. B.; Low, Z. J.; Ho, Y. S. ;*TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *66*, 1.
61. Szultka, M.; Pomastowski, P.; Railean-Plugaru, V.; Buszewski, B. ;*J Sep Sci* **2014**, *37*, 3094.
62. Gama, M. R.; Bottoli, C. B. G. ;*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2017**, *1043*, 107.
63. Poole, C.; Mester, Z.; Miró, M.; Pedersen-Bjergaard, S.; Pawliszyn, J. ;*Pure and Applied Chemistry* **2016**, *88*, 649.
64. Zhang, P.; Carlin, S.; Lotti, C.; Mattivi, F.; Vrhovsek, U. ;*Metabolomics* **2020**, *16*, 1.
65. Lashgari, M.; Singh, V.; Pawliszyn, J. A critical review on regulatory sample preparation methods: Validating solid-phase microextraction techniques. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *119*.
66. Lashgari, M.; Singh, V.; Pawliszyn, J. A critical review on regulatory sample preparation methods: Validating solid-phase microextraction techniques. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *119*.
67. Pawliszyn, J. *Solid phase microextraction: theory and practice*; Wiley, 1997; Vol. 61.
68. Kasperkiewicz, A.; Pawliszyn, J. ;*Food Chem* **2021**, *339*, 127815.
69. Pawliszyn, J. *Theory of Solid-Phase Microextraction*; Elsevier Inc., 2012.
70. Naccarato, A.; Pawliszyn, J. ;*Food Chem* **2016**, *206*, 67.
71. Xu, J.; Ouyang, G. In *Encyclopedia of Analytical Science*; Elsevier, 2019; pp. 100–108.
72. Risticovic, S.; Pawliszyn, J. **2000**.
73. Pawliszyn, J. *Handbook of Solid Phase Microextraction*; 2012.
74. Piergiovanni, M.; Gosetti, F.; Rocío-Bautista, P.; Termopoli, V. Aroma determination in alcoholic beverages: Green MS-based sample preparation approaches. *Mass Spectrom Rev* **2022**.
75. Augusto, F.; Hantao, L. W.; Mogollón, N. G. S.; Braga, S. C. G. N. New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2013**, *43*, 14–23.
76. Schmidt, K.; Podmore, I. ;*J Mol Biomark Diagn* **2015**, *06*.
77. Zhang, Z.; Pawliszyn, J. ;*Anal Chem* **1993**, *65*, 1843.
78. Ferreira, S. L. C.; Silva Junior, M. M.; Felix, C. S. A.; da Silva, D. L. F.; Santos, A. S.; Santos Neto, J. H.; de Souza, C. T.; Cruz Junior, R. A.; Souza, A. S. ;*Food Chem* **2019**, *273*, 3.
79. Kataoka, H.; Lord, H. L.; Pawliszyn, J. *Applications of solid-phase microextraction in food analysis*; 2000; Vol. 880.
80. Souza-Silva, É. A.; Jiang, R.; Rodríguez-Lafuente, A.; Gionfriddo, E.; Pawliszyn, J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *71*, 224–235.

81. Boyaci, E.; Rodríguez-Lafuente, Á.; Gorynski, K.; Mirnaghi, F.; Souza-Silva, É. A.; Hein, D.; Pawliszyn, J. Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases. *Anal Chim Acta* **2015**, *873*, 14–30.
82. Pascari, X.; Ramos, A. J.; Marín, S.; Sanchís, V. ;*Food Research International* **2018**, *103*, 121.
83. Baert, J. J.; De Clippeleer, J.; Bustillo Trueba, P.; Jaskula-Goiris, B.; De Rouck, G.; Aerts, G.; De Cooman, L. ;*Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2018**, *76*, 257.
84. Coelho Neto, D. M.; Moreira, L. L. P. F.; de Castro, E. V. R.; Souza, W. B.; Filgueiras, P. R.; Romão, W.; Folli, G. S.; Lacerda, V. ;*Quim Nova* **2022**, *45*, 518.
85. Bossaert, S.; Winne, V.; Van Opstaele, F.; Buyse, J.; Verreth, C.; Herrera-Malaver, B.; Van Geel, M.; Verstrepen, K. J.; Crauwels, S.; De Rouck, G.; Lievens, B. ;*Int J Food Microbiol* **2021**, *339*.
86. Bauwens, J.; Van Opstaele, F.; Eggermont, L.; Weiland, F.; Jaskula-Goiris, B.; De Rouck, G.; De Brabanter, J.; Aerts, G.; De Cooman, L. ;*Journal of the Institute of Brewing* **2021**.
87. Olaniran, A. O.; Hiralal, L.; Mokoena, M. P.; Pillay, B. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing* **2017**, *123*, 13–23.
88. Lehnhardt, F.; Becker, T.; Gastl, M. ;*European Food Research and Technology* **2020**, *246*, 1105.
89. Hughey, C. A.; McMinn, C. M.; Phung, J. ;*Metabolomics* **2016**, *12*, 1.
90. Benucci, I.; Cecchi, T.; Lombardelli, C.; Maresca, D.; Mauriello, G.; Esti, M. ;*Food Chem* **2021**, *340*, 127900.
91. Andrés-Iglesias, C.; Blanco, C. A.; García-Serna, J.; Pando, V.; Montero, O. ;*Food Anal Methods* **2016**, *9*, 3230.
92. Silva, G. A. da; Augusto, F.; Poppi, R. J. ;*Food Chem* **2008**, *111*, 1057.
93. Ji, X. ;*Flavour Fragr J* **2021**, *36*, 374.
94. Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. *Fundamentos de cromatografia.*; Editorada Unicamp, 2006.
95. Rahim, M. A.; Ayub, H.; Sehrish, A.; Ambreen, S.; Khan, F. A.; Itrat, N.; Nazir, A.; Shoukat, A.; Shoukat, A.; Ejaz, A.; Özogul, F.; Bartkiene, E.; Rocha, J. M. Essential Components from Plant Source Oils: A Review on Extraction, Detection, Identification, and Quantification. *Molecules* **2023**, *28*.
96. Marriott, P. J.; Shellie, R.; Cornwell, C. *Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils*; 2001.
97. Mota, M. F. S.; Waktola, H. D.; Nolvachai, Y.; Marriott, P. J. Gas chromatography – mass spectrometry for characterisation, assessment of quality and authentication of seed and vegetable oils. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2021**, *138*.

98. Dugo, G.; Quinto Tranchida, P.; Cotroneo, A.; Dugo, P.; Bonaccorsi, I.; Marriott, P.; Shellie, R.; Mondello, L. Advanced and innovative chromatographic techniques for the study of citrus essential oils. *Flavour Fragr J* **2005**, *20*, 249–264.
99. Gould, O.; Nguyen, N.; Honeychurch, K. C. New Applications of Gas Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry for Novel Sample Matrices in the Forensic Sciences: A Literature Review. *Chemosensors* **2023**, *11*.
100. Gracia-Moreno, E.; Lopez, R.; Ferreira, V. ;*Anal Bioanal Chem* **2015**, *407*, 7925.
101. Coelho Neto, D. M.; Moreira, L. L. P. F.; de Castro, E. V. R.; Souza, W. B.; Filgueiras, P. R.; Romão, W.; Folli, G. S.; Lacerda, V. ;*Quim Nova* **2022**, *45*, 518.
102. Das, M. K.; Bishwal, S. C.; Das, A.; Dabral, D.; Varshney, A.; Badireddy, V. K.; Nanda, R. ;*Anal Chem* **2014**, *86*, 1229.
103. Humston-Fulmer, E. M.; Alonso, D. E.; Binkley, J. E. *Improving cannabis differentiation by expanding coverage of the chemical profile with GCxGC-TOFMS*; 1st ed.; Elsevier B.V., 2020.
104. Keshet, U.; Goldshlag, P.; Amirav, A. ;*Anal Bioanal Chem* **2018**, *410*, 5507.
105. Humston, E. M.; Zhang, Y.; Brabeck, G. F.; McShea, A.; Synovec, R. E. ;*J Sep Sci* **2009**, *32*, 2289.
106. Costa, R.; Fanali, C.; Pennazza, G.; Tedone, L.; Dugo, L.; Santonico, M.; Sciarrone, D.; Cacciola, F.; Cucchiaroni, L.; Dachà, M.; Mondello, L. ;*LWT - Food Science and Technology* **2015**, *60*, 905.
107. Costa, R.; Fanali, C.; Pennazza, G.; Tedone, L.; Dugo, L.; Santonico, M.; Sciarrone, D.; Cacciola, F.; Cucchiaroni, L.; Dachà, M.; Mondello, L. ;*LWT - Food Science and Technology* **2015**, *60*, 905.
108. Piotrowski, P.; Place, B. ;*Separations* **2019**, *6*.
109. Kamatou, G.; Sandasi, M.; Tankeu, S.; Vuuren, S. van; Viljoen, A. ;*Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2019**, *29*, 351.
110. Dunkle, M. N.; Pijcke, P.; Winniford, B.; Bellos, G. ;*J Chromatogr A* **2019**, *1587*, 239.
111. Ozel, M. Z.; Yanik, D. K.; Gogus, F.; Hamilton, J. F.; Lewis, A. C. ;*LWT - Food Science and Technology* **2014**, *59*, 283.
112. Kandikattu, H. K.; Rachitha, P.; Jayashree, G. V.; Krupashree, K.; Sukhith, M.; Majid, A.; Amruta, N.; Khanum, F. ;*Biomedicine and Pharmacotherapy* **2017**, *91*, 191.
113. Kandikattu, H. K.; Rachitha, P.; Jayashree, G. V.; Krupashree, K.; Sukhith, M.; Majid, A.; Amruta, N.; Khanum, F. ;*Biomedicine and Pharmacotherapy* **2017**, *91*, 191.
114. Pellattiero, E.; Cecchinato, A.; Tagliapietra, F.; Schiavon, S.; Bittante, G. ;*J Agric Food Chem* **2015**, *63*, 963.
115. Marriott, P. J.; Nolvachai, Y. ;*Separation Science and Technology (New York)* **2020**, *12*, 41.
116. Shellie, R.; Marriott, P.; Cornwall, C. ;*J Sep Sci* **2001**, *24*, 823.

117. Amaral, M. S. S.; Nolvachai, Y.; Marriott, P. J. Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography Advances in Technology and Applications: Biennial Update. *Anal Chem* **2020**, *92*, 85–104.
118. Chin, S. T.; Eyres, G. T.; Marriott, P. J. ;*J Chromatogr A* **2011**, *1218*, 7487.
119. Mühlen, C. Von; Alcaraz, C.; Bastos, E.; Marriott, P. J. **2007**, *30*, 682.
120. Vendevre, C.; Ruiz-Guerrero, R.; Bertocini, F.; Duval, L.; Thiébaud, D. Comprehensive two-dimensional gas chromatography for detailed characterisation of petroleum products. *Oil and Gas Science and Technology* **2007**, *62*, 43–55.
121. Pedroso, M. P.; Godoy, L. A. F. de; Fidélis, C. H. de V.; Ferreira, E. C.; Poppi, R. J.; Augusto, F. ;*Quim Nova* **2009**, *32*, 422.
122. *Universidade Federal do Rio Grande do Sul Programa de Pós-Graduação em Química ESTUDO DA VIABILIDADE DE USO DA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE (GC×GC) NO ESTUDO DE HIDROCARBONETOS POLIAROMÁTICOS (HPA) EM SEDIMENTOS* Msc. Luiza Placidina da Luz.
123. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. T. ;*TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*, 438.
124. Giddings, J. C. ;*Journal of High Resolution Chromatography* **1987**, *10*, 319.
125. Phillips, J. B.; Xu, J. *Comprehensive multi-dimensional gas chromatography*; 1995; Vol. 703.
126. Marriott, P. J. Addressing the Challenges to Identification in Gas Chromatography by Increased Resolution and Enhanced Detection Modalities. *Chem Asian J* **2018**, *13*, 1849–1856.
127. Mondello, L.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Dugo, G. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: A review. *Mass Spectrom Rev* **2008**, *27*, 101–124.
128. Tranchida, P. Q.; Franchina, F. A.; Dugo, P.; Mondello, L. ;*Mass Spectrom Rev* **2016**, *35*, 524.
129. Debonneville, C.; Chaintreau, A. In *Journal of Chromatography A*; Elsevier, 2004; Vol. 1027, pp. 109–115.
130. Mondello, L.; Casilli, A.; Tranchida, P. Q.; Dugo, G.; Dugo, P. ;*J Chromatogr A* **2005**, *1067*, 235.
131. Tranchida, P. Q.; Purcaro, G.; Maimone, M.; Mondello, L. Impact of comprehensive two-dimensional gas chromatography with mass spectrometry on food analysis. *J Sep Sci* **2016**, *39*, 149–161.
132. Tranchida, P. Q.; Franchina, F. A.; Dugo, P.; Mondello, L. ;*Mass Spectrom Rev* **2016**, *35*, 524.
133. Pedroso, M. P. ;*Scientia Chromatographica* **2011**, *3*, 145.
134. Ochoa, G. S.; Sudol, P. E.; Trinklein, T. J.; Synovec, R. E. ;*Talanta* **2022**, *236*, 122844.
135. Prebihalo, S. E.; Berrier, K. L.; Freye, C. E.; Bahaghighat, H. D.; Moore, N. R.; Pinkerton, D. K.; Synovec, R. E. ;*Anal Chem* **2018**, *90*, 505.

136. Franchina, F. A.; Zanella, D.; Dubois, L. M.; Focant, J. F. The role of sample preparation in multidimensional gas chromatographic separations for non-targeted analysis with the focus on recent biomedical, food, and plant applications. *J Sep Sci* **2021**, *44*, 188–210.
137. Yu, M.; Yang, P.; Song, H.; Guan, X. Research progress in comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry and its combination with olfactometry systems in the flavor analysis field. *Journal of Food Composition and Analysis* **2022**, *114*.
138. Aspromonte, J.; Mascrez, S.; Eggermont, D.; Purcaro, G. Solid-phase microextraction coupled to comprehensive multidimensional gas chromatography for food analysis. *Anal Bioanal Chem* **2023**.
139. Cortes, H. J.; Winniford, B.; Luong, J.; Pursch, M. Comprehensive two dimensional gas chromatography review. *J Sep Sci* **2009**, *32*, 883–904.
140. Fan, C. C.; Lin, T. F. ;*Chemosphere* **2018**, *200*, 48.
141. Van Doorn, G.; Watson, S.; Timora, J.; Spence, C. ;*Food Qual Prefer* **2020**, *79*.
142. Nardini, M.; Garaguso, I. ;*Food Chem* **2020**, *305*, 125437.
143. Vrzal, T.; Slabý, M.; Kubizniaková, P.; Horák, T.; Olšovská, J. ;*Food Microbiol* **2023**, *115*.
144. Pires, E. J.; Teixeira, J. A.; Brányik, T.; Vicente, A. A. Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **2014**, *98*, 1937–1949.
145. Rodríguez Madrera, R.; Pando Bedriñana, R.; Suárez Valles, B. ;*European Food Research and Technology* **2021**, *247*, 819.
146. Machado, J. C.; Faria, M. A.; Melo, A.; Martins, Z. E.; Ferreira, I. M. P. L. V. O. ;*Food Chem* **2019**, *278*, 216.
147. Chen, W.; Becker, T.; Qian, F.; Ring, J. ;*Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* **2014**, *28*, 142.
148. Gasinski, A.; Kawa-Rygielska, J.; Szumny, A.; Czubaszek, A.; Gasiior, J.; Pietrzak, W. ;*Molecules* **2020**, *25*.
149. Gasiński, A.; Kawa-Rygielska, J.; Szumny, A.; Gasiior, J.; Głowacki, A. ;*Foods* **2020**, *9*, 775.
150. Alvim, R. P. R.; de Cássia Oliveira Gomes, F.; Garcia, C. F.; de Lourdes Almeida Vieira, M.; de Resende Machado, A. M. ;*Journal of the Institute of Brewing* **2017**, *123*, 219.
151. Rong, L.; Peng, L. J.; Ho, C. T.; Yan, S. H.; Meurens, M.; Zhang, Z. Z.; Li, D. X.; Wan, X. C.; Bao, G. H.; Gao, X. L.; Ling, T. J. ;*Food Chem* **2016**, *197*, 161.
152. Gasiński, A.; Kawa-Rygielska, J.; Paszkot, J.; Pietrzak, W.; Śniegowska, J.; Szumny, A. ;*Lwt* **2022**, *159*.
153. Adams, R. P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy*; Allured Pub. Corp, 2007.
154. Hibbert, D. B. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2012**, *910*, 2–13.

155. Narendran, S. T.; Meyyanathan, S. N.; Karri, V. V. S. R. Experimental design in pesticide extraction methods: A review. *Food Chem* **2019**, *289*, 384–395.
156. Ferreira, S. L. C.; Lemos, V. A.; de Carvalho, V. S.; da Silva, E. G. P.; Queiroz, A. F. S.; Felix, C. S. A.; da Silva, D. L. F.; Dourado, G. B.; Oliveira, R. V. Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. *Microchemical Journal* **2018**, *140*, 176–182.
157. Wang, X.; Zhu, L.; Han, Y.; Xu, L.; Jin, J.; Cai, Y.; Wang, H. ;*J Food Process Preserv* **2018**, *42*, 1.
158. Carnol, L.; Schummer, C.; Moris, G. ;*Food Anal Methods* **2017**, *10*, 298.
159. Cincotta, F.; Verzera, A.; Tripodi, G.; Conduurso, C. ;*Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **2018**, *35*, 512.
160. Mesquita, P. R. R.; Nunes, E. C.; Santos, F. N. dos; Bastos, L. P.; Costa, M. A. P. C.; de M. Rodrigues, F.; de Andrade, J. B. ;*Microchemical Journal* **2017**, *130*, 79.
161. Xu, L.; Yu, X.; Li, M.; Chen, J.; Wang, X. ;*Int J Food Prop* **2018**, *20*, 2926.
162. Souza Silva, É. A.; Saboia, G.; Jorge, N. C.; Hoffmann, C.; dos Santos Isaias, R. M.; Soares, G. L. G.; Zini, C. A. ;*Talanta* **2017**, *175*, 9.
163. Riu-Aumatell, M.; Miró, P.; Serra-Cayuela, A.; Buxaderas, S.; López-Tamames, E. ;*Food Research International* **2014**, *57*, 196.
164. Da Silva, G. C.; Da Silva, A. A. S.; Da Silva, L. S. N.; Godoy, R. L. D. O.; Nogueira, L. C.; Quitério, S. L.; Raices, R. S. L. ;*Food Chem* **2015**, *167*, 71.
165. Vazquez, A. M.; Aimar, M. L.; Demmel, G. I.; Decarlino, M. F.; Díaz-Panero, M.; Cantero, J. J. ;*Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromat* **2019**, *18*, 492.
166. Rondan-Sanabria, G. G.; Garcia, A. J. C.; Montaña, H. S. P.; Arias, E. C. S.; Narain, N. ;*Revista de Ciências Agrárias* **2019**, *42*, 261.
167. Mousavi, L.; Tamiji, Z.; Khoshayand, M. R. Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method – A review. *Talanta* **2018**, *190*, 335–356.
168. Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S.; Escaleira, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **2008**, *76*, 965–977.
169. Ferreira, S. L. C.; Dos Santos, W. N. L.; Quintella, C. M.; Neto, B. B.; Bosque-Sendra, J. M. ;*Talanta* **2004**, *63*, 1061.
170. Bezerra, M. de A. **2003**, 71.
171. Harynuk, J.; Gorecki, T. ;*J Sep Sci* **2002**, *25*, 304.
172. Pollo, B. J.; Teixeira, C. A.; Belinato, J. R.; Furlan, M. F.; Cunha, I. C. de M.; Vaz, C. R.; Volpato, G. V.; Augusto, F. ;*TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2021**, *134*, 116111.
173. Campinas, U. E. De **2017**.
174. Mousavi, L.; Tamiji, Z.; Khoshayand, M. R. Applications and opportunities of experimental design for the dispersive liquid–liquid microextraction method – A review. *Talanta* **2018**, *190*, 335–356.

175. Bezerra, M. A.; Ferreira, S. L. C.; Novaes, C. G.; dos Santos, A. M. P.; Valasques, G. S.; da Mata Cerqueira, U. M. F.; dos Santos Alves, J. P. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. *Talanta* **2019**, *194*, 941–959.
176. Stefanuto, P. H.; Perrault, K. A.; Dubois, L. M.; L’Homme, B.; Allen, C.; Loughnane, C.; Ochiai, N.; Focant, J. F. ;*J Chromatogr A* **2017**, *1507*, 45.
177. Stefanuto, P. H.; Perrault, K. A.; Dubois, L. M.; L’Homme, B.; Allen, C.; Loughnane, C.; Ochiai, N.; Focant, J. F. ;*J Chromatogr A* **2017**, *1507*, 45.
178. Salazar, M. O.; Pisano, P. L.; González Sierra, M.; Furlan, R. L. E. ;*Microchemical Journal* **2018**, *141*, 264.
179. Pollo, B. J.; Teixeira, C. A.; Belinato, J. R.; Furlan, M. F.; Cunha, I. C. de M.; Vaz, C. R.; Volpato, G. V.; Augusto, F. Chemometrics, Comprehensive Two-Dimensional gas chromatography and “omics” sciences: Basic tools and recent applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2021**, *134*.
180. Tarley, C. R. T.; Silveira, G.; dos Santos, W. N. L.; Matos, G. D.; da Silva, E. G. P.; Bezerra, M. A.; Miró, M.; Ferreira, S. L. C. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal* **2009**, *92*, 58–67.
181. Kumar, K. ;*Analytical Methods* **2018**, *10*, 190.
182. Zhang, X. Z.; Feng, N.; Ma, A. J.; Li, B. Q. ;*J Sep Sci* **2020**, *43*, 552.
183. Abou-el-karam, S.; Ratel, J.; Kondjoyan, N.; Truan, C.; Engel, E. ;*Anal Chim Acta* **2017**, *991*, 58.
184. Tomasi, G.; Savorani, F.; Engelsen, S. B. ;*J Chromatogr A* **2011**, *1218*, 7832.
185. Pérez-Castaño, E.; Sánchez-Viñas, M.; Gázquez-Evangelista, D.; Bagur-González, M. G. ;*Food Chem* **2018**, *239*, 1192.
186. Svetič, S.; Vrečer, F.; Korasa, K. ;*J Drug Deliv Sci Technol* **2023**, 105201.
187. Casson, A.; Zambelli, M.; Giovenzana, V.; Tugnolo, A.; Pampuri, A.; Vignati, S.; Beghi, R.; Guidetti, R. Simplified environmental impact tools for agri-food system: A systematic review on trends and future prospective. *Environ Impact Assess Rev* **2023**, *102*.
188. Alves, L. M. F. **2014**, 34.
189. Silva, G. A. da; Augusto, F.; Poppi, R. J. ;*Food Chem* **2008**, *111*, 1057.
190. Hege, M.; Jung, F.; Sellmann, C.; Jin, C.; Ziegenhardt, D.; Hellerbrand, C.; Bergheim, I. ;*Nutrition* **2018**, *45*, 68.
191. Gonzalez Viejo, C.; Fuentes, S.; Godbole, A.; Widdicombe, B.; Unnithan, R. R. ;*Sens Actuators B Chem* **2020**.
192. Ji, X. ;*Flavour Fragr J* **2021**, *36*, 374.
193. Hu, S.; Deng, H.; Liu, R.; Yu, W. ;*Int J Biol Macromol* **2021**, *193*, 661.
194. Paiva, A. C.; Hantao, L. W. ;*J Chromatogr A* **2020**, *1630*, 461529.
195. Paiva, A. C.; Oliveira, D. S.; Hantao, L. W. ;*Separations* **2019**, *6*.

196. Koller, H.; Perkins, L. B. Brewing and the Chemical Composition of Amine-Containing Compounds in Beer: A Review. *Foods* **2022**, *11*.
197. Techakriengkrai, I.; Paterson, A.; Taidi, B.; Piggott, J. R. ;*Journal of the Institute of Brewing* **2004**, *110*, 51.
198. Nešpor, J.; Andrés-Iglesias, C.; Karabín, M.; Montero, O.; Blanco, C. A.; Dostálek, P. ;*Food Anal Methods* **2019**, *12*, 2293.
199. Marsili, R. T.; Laskonis, C. R. ;*Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2019**, *77*, 113.
200. Gonzalez Viejo, C.; Fuentes, S.; Torrico, D. D.; Godbole, A.; Dunshea, F. R. ;*Food Chem* **2019**, *293*, 479.
201. Almstetter, M. F.; Oefner, P. J.; Dettmer, K. ;*Anal Bioanal Chem* **2012**, *402*, 1993.
202. Tranchida, P. Q. ;*J Chromatogr A* **2018**, *1536*, 2.
203. Aloisi, I.; Schena, T.; Giocastro, B.; Zoccali, M.; Tranchida, P. Q.; Caramão, E. B.; Mondello, L. ;*Anal Chim Acta* **2020**, *1105*, 231.
204. Alexandrino, G. L.; de Sousa, G. R.; de A.M. Reis, F.; Augusto, F. ;*J Chromatogr A* **2018**, *1536*, 82.
205. Da Silva, G. C. **2013**, 70.
206. Trenholm, R. a; Rosario-Ortiz, F. L.; Snyder, S. a ;*J Chromatogr A* **2008**, *1210*, 25.
207. de Lima Gomes, P. C. F.; Barletta, J. Y.; Nazario, C. E. D.; Santos-Neto, Á. J.; von Wolff, M. A.; Coneglian, C. M. R.; Umbuzeiro, G. A.; Lancas, F. M. ;*J Sep Sci* **2011**, *34*, 436.
208. Paiva, A. C.; Hantao, L. W. ;*J Chromatogr A* **2020**, *1630*, 461529.
209. Shen, V. K. , S. D. W. , K. W. P. , and H. H. W. , Eds. NIST Standard Reference Simulation Website, NIST Standard Reference Database Number 173.
210. Gough, D. V.; Bahaghighat, H. D.; Synovec, R. E. ;*Talanta* **2019**, *195*, 822.
211. Chen, J.; Tang, J.; Shi, H.; Tang, C.; Zhang, R. ;*J Basic Microbiol* **2017**, *57*, 228.
212. Lee, J.; Jang, H. W.; Jeong, M. C.; Yoo, S. R.; Ha, J. ;*J Food Biochem* **2017**, *41*, 1.
213. Palassarou, M.; Melliou, E.; Liouni, M.; Michaelakis, A.; Balayiannis, G.; Magiatis, P. ;*J Sci Food Agric* **2017**, *97*, 5254.
214. Lenti, L.; Scortichini, S.; Pacetti, D.; Cespi, M.; Fiorini, D. ;*Food Research International* **2021**, *148*, 110632.
215. Fracassetti, D.; Vigentini, I.; Lo Faro, A.; De Nisi, P.; Foschino, R.; Tirelli, A.; Orioli, M.; Iriti, M. ;*Foods* **2019**, *8*, 99.
216. Humia, B. V.; Santos, K. S.; Barbosa, A. M.; Sawata, M.; Mendonça, M. da C.; Padilha, F. F. ;*Molecules* **2019**, *24*.
217. Yorke, J.; Cook, D.; Ford, R. ;*Beverages* **2021**, *7*, 1.
218. Akpoghelie, P. O.; Edo, G. I.; Akhayere, E. ;*Biocatal Agric Biotechnol* **2022**, *45*.

219. 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 Chem* **2015**, *172*, 742–756.
220. Pina, R. L.; Cruz, D. C. P.; Martelli, M. C. ;*Research, Society and Development* **2022**, *11*, e43111738868.
221. Kumar Verma, D.; Srivastav, P. P. *INTRODUCTION TO RICE AROMA, FLAVOR, AND FRAGRANCE*.
222. Sawamura, M.; Thi Minh Tu, N.; Onishi, Y.; Ogawa, E.; Choi, H. S. ;*Biosci Biotechnol Biochem* **2004**, *68*, 1690.
223. Mitri, S.; Salameh, S.-J.; Khelfa, A.; Leonard, E.; Maroun, R. G.; Louka, N.; Koubaa, M. ;*Fermentation* **2022**, *8*, 50.
224. Gonzalez Viejo, C.; Fuentes, S.; Howell, K.; Torrico, D. D.; Dunshea, F. R. ;*Physiol Behav* **2019**, *200*, 139.
225. Lafontaine, S.; Varnum, S.; Roland, A.; Delpech, S.; Dagan, L.; Vollmer, D.; Kishimoto, T.; Shellhammer, T. ;*Food Chem* **2019**, *278*, 228.
226. Rinnan, Å.; Savorani, F.; Engelsen, S. B. ;*Anal Chim Acta* **2018**, *1021*, 20.
227. Muro, C. K.; Doty, K. C.; de Souza Fernandes, L.; Lednev, I. K. ;*Forensic Chemistry* **2016**, *1*, 31.
228. Tomasi, G.; Savorani, F.; Engelsen, S. B. ;*J Chromatogr A* **2011**, *1218*, 7832.
229. Giraud, A.; Calvini, R.; Orlandi, G.; Ulrici, A.; Geobaldo, F.; Savorani, F. ;*Food Control* **2018**, *94*, 233.
230. De Géa Neves, M.; Poppi, R. J.; Breitkreitz, M. C. ;*Food Control* **2022**, *132*.
231. STONE, H.; SIDEL, J. L. *SENSORY EVALUATION PRACTICES*; 3rd ed.; PRESS, CALIFORNIA ACADEMIC: SAN DIEGO, 2004.
232. Pedroso, M. P.; Antonio, L.; Godoy, F. De; Henrique, C.; Fidélis, D. V.; Correa, E.; Jesus, R.; Augusto, F. **2009**, *32*, 421.
233. Pires Valente, A. L.; Augusto, F. ;*Quim Nova* **2000**, *23*, 523.
234. Gionfriddo, E.; Souza-Silva, E. A.; Pawliszyn, J. ;*Anal Chem* **2015**, *87*, 8448.
235. Bahaghighat, H. D.; Freye, C. E.; Synovec, R. E. Recent advances in modulator technology for comprehensive two dimensional gas chromatography. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *113*, 379–391.
236. Kalogiouri, N. P.; Aalizadeh, R.; Dasenaki, M. E.; Thomaidis, N. S. ;*Anal Chim Acta* **2020**, *1134*, 150.
237. Pilon, A. C.; Selegato, D. M.; Fernandes, R. P.; Bueno, P. C. P.; Pinho, D. R.; Neto, F. C.; Freire, R. T.; Castro-Gamboa, I.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P. ;*Quim Nova* **2020**, *43*, 329.
238. Ferreira, R. de A.; Teixeira, G.; Peternelli, L. A. ;*Ciência Rural* **2022**, *52*.
239. Pieczonka, S. A.; Lucio, M.; Rychlik, M.; Schmitt-Kopplin, P. ;*NPJ Sci Food* **2020**, *4*.
240. Mattarucchi, E.; Stocchero, M.; Moreno-Rojas, J. M.; Giordano, G.; Reniero, F.; Guillou, C. ;*J Agric Food Chem* **2010**, *58*, 12089.

241. Cajka, T.; Riddellova, K.; Tomaniova, M.; Hajslova, J. ;*Metabolomics* **2011**, 7, 500.
242. Heuberger, A. L.; Broeckling, C. D.; Lewis, M. R.; Salazar, L.; Bouckaert, P.; Prenni, J. E. ;*Food Chem* **2012**, 135, 1284.
243. Araújo, A. S.; Da Rocha, L. L.; Tomazela, D. M.; Sawaya, A. C. H. F.; Almeida, R. R.; Catharino, R. R.; Eberlin, M. N. ;*Analyst* **2005**, 130, 884.
244. Sommella, E.; Pagano, F.; Salviati, E.; Chieppa, M.; Bertamino, A.; Manfra, M.; Sala, M.; Novellino, E.; Campiglia, P. ;*J Sep Sci* **2018**, 41, 1548.
245. Gonçalves, J. L.; Figueira, J. A.; Rodrigues, F. P.; Ornelas, L. P.; Branco, R. N.; Silva, C. L.; Câmara, J. S. ;*Food Chem* **2014**, 160, 266.
246. Pope, G. A.; MacKenzie, D. A.; Defernez, M.; Aroso, M. A. M. M.; Fuller, L. J.; Mellon, F. A.; Dunn, W. B.; Brown, M.; Goodacre, R.; Kell, D. B.; Marvin, M. E.; Louis, E. J.; Roberts, I. N. ;*Yeast* **2007**, 24, 667.
247. Haseleu, G.; Intelmann, D.; Hofmann, T. ;*Food Chem* **2009**, 116, 71.
248. Silva, P. H. A. Da; Faria, F. C. De ;*Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2008**, 28, 902.
249. Inui, T.; Matsui, H.; Hosoya, T.; Kumazawa, S.; Fukui, N.; Oka, K. ;*Journal of the American Society of Brewing Chemists* **2016**, 74, 231.
250. Durello, R. S.; Silva, L. M.; Bogusz, S. ;*Quim Nova* **2019**, 42, 900.
251. Lafontaine, S.; Varnum, S.; Roland, A.; Delpech, S.; Dagan, L.; Vollmer, D.; Kishimoto, T.; Shellhammer, T. ;*Food Chem* **2019**, 278, 228.
252. Titus, B. M.; Lerno, L. A.; Beaver, J.; Byrnes, N. K.; Heymann, H.; Oberholster, A. ;*Foods* **2021**, 10.
253. von Mühlen, C.; Zini, C. A.; Caramão, E. B.; Marriott, P. J. ;*J Chromatogr A* **2008**, 1200, 34.
254. The Metabolomics Innovation Centre-TMIC <https://metabolomicscentre.ca/about-us/>.
255. The Good Science Company <http://www.thegoodscentcompany.com/>.
256. Stan Hieronymus *LÚPULO: guia prático para o aroma, amargor e cultivo de lúpulos.*; editora Krater, Ed.; 2nd ed.; Belo Horizonte, 2020; Vol. 1.
257. Stan Hieronymus *For the love of hops, The practical guide to Aroma, bitterness and the culture of hops*; 2012.
258. Daniel C. Sharp; YanPing Qian; Jeff Clawson; Thomas H. Shellhammer ;*Technical Quarterly* **2017**, 54.
259. Praet, T.; Van Opstaele, F.; Steenackers, B.; De Brabanter, J.; De Vos, D.; Aerts, G.; De Cooman, L. ;*Food Research International* **2015**, 75, 1.
260. Chyau, C. C.; Mau, J. L.; Wu, C. M. ;*J Agric Food Chem* **1996**, 44, 1096.
261. Cvijetić, I.; Bigović, M.; Ristivojević, P.; Vitorović-Todorović, M.; Zloh, M.; Milojković-Opsenica, D. ;*Struct Chem* **2021**, 32, 2051.
262. Da Silva, S. L.; Figueiredo, P. M.; Yano, T. ;*Acta Amazon* **2007**, 37, 281.
263. The Good Science Company <http://www.thegoodscentcompany.com/>.

264. Martins, C.; Brandão, T.; Almeida, A.; Rocha, S. M. ;*J Sep Sci* **2017**, *40*, 2228.
265. Osorio, M.; Moreno, F. L.; Hernández, E.; Filomena-Ambrosio, A.; Osorio, C.; Ruiz, Y. ;*LWT* **2024**, *191*.
266. Zapata, P. J.; Martínez-Esplá, A.; Gironés-Vilaplana, A.; Santos-Lax, D.; Noguera-Artiaga, L.; Carbonell-Barrachina, Á. A. ;*Lwt* **2019**, *103*, 139.
267. Zapata, P. J.; Martínez-Esplá, A.; Gironés-Vilaplana, A.; Santos-Lax, D.; Noguera-Artiaga, L.; Carbonell-Barrachina, Á. A. ;*Lwt* **2019**, *103*, 139.
268. Duarte, L. M.; Amorim, T. L.; Grazul, R. M.; de Oliveira, M. A. L. ;*Food Research International* **2020**, *138*.
269. Buško, M.; Kulik, T.; Ostrowska, A.; Góral, T.; Perkowski, J. ;*FEMS Microbiol Lett* **2014**, *359*, 85.

APÊNDICE

Apêndice 1

Cromatogramas de impressões digitais bidimensionais de amostras de cerveja Lager obtidas pelo método otimizado HS-SPME-GCxGC-QMS. # =códigos de amostra.

