



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PAOLLA LORRAYNE MACIEL RODRIGUES ALMEIDA

Estudo da síntese de um análogo de alfa-ácido presente em lúpulo e
correlação do comportamento eletroanalítico com o amargor da cerveja

UBERLÂNDIA

2019

PAOLLA LORRAYNE MACIEL RODRIGUES ALMEIDA

Estudo da síntese de um análogo de alfa-ácido presente em lúpulo e correlação do comportamento eletroanalítico com o amargor da cerveja

Defesa da dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Raquel M. F. Sousa

Coorientador: Prof. Dr. Rodrigo A. A. Munoz

UBERLÂNDIA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A447e Almeida, Paolla Lorryne Maciel Rodrigues, 1985
2019 Estudo da síntese de um análogo de alfa-ácido presente em lúpulo e
correlação do comportamento eletroanalítico com o amargor da cerveja
[recurso eletrônico] / Paolla Lorryne Maciel Rodrigues Almeida. -
2019.

Orientadora: Raquel Maria Ferreira de Sousa.
Coorientador: Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.1287>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Química. 2. Cerveja - Sabor e aroma. 3. Eletroquímica. 4. Ácidos.
I. Sousa, Raquel Maria Ferreira de, 1981, (Orient.). II. Abarza Muñoz,
Rodrigo Alejandro, 1980, (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 298/PPQUI.

DATA: 27/02/2019

DISCENTE: Paolla Lorryne Maciel Rodrigues Almeida

MATRÍCULA: 11712QMI008

TÍTULO DO TRABALHO: Síntese de um análogo de iso-humulona para aplicação de padrão analítico na determinação eletroquímica do amargor em cervejas.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estudo de metabólitos secundários de lúpulo em cerveja

Às nove horas do dia vinte e sete de fevereiro de dois mil e dezenove, no(a) Sala de Reuniões do Instituto de Química da UFU, Bloco 1D, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior, Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. David Maikel Fernandes, Universidade de Uberaba e Profª Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Estudo da síntese de um análogo de alfa-acido presente em lúpulo e correlação do comportamento eletroquímico com o amargor da cerveja.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 13 horas e 00 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende Júnior

Prof. Dr. David Maikel Fernandes

Profª Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa

PAOLLA LORRAYNE MACIEL RODRIGUES ALMEIDA

Estudo da síntese de um análogo de alfa-ácido presente em lúpulo e
correlação do comportamento eletroanalítico com o amargor da cerveja

Defesa da dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química do
Instituto de Química da Universidade Federal
de Uberlândia, como requisito para a obtenção
do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Uberlândia, 27 de fevereiro de 2019

Banca examinadora:

Prof. Dr. Raquel Maria Ferreira de Sousa
(Orientador – UFU)

Prof. Dr. Celso de Oliveira Rezende júnior
(Examinador – UFU)

Prof. Dr. David Maikel Fernandes
(Examinador – Universidade de Uberaba)

A Deus.

Aos meus familiares

“Toda a ciência é uma questão de seleção pela qual encontramos a agulha da verdade no palheiro da experiência.”

Thomas Rogers

Agradecimentos

A Deus, por possibilitar a conclusão deste trabalho.

Ao meu esposo, Eduardo Santos Almeida, por todo incentivo, ajuda e paciência que teve durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu filho Eduardo, que com toda docura e inocência me incentiva sempre.

A Profa. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa, pela orientação, ensinamentos e confiança.

Ao professor Marcos Pivatto, por compartilhar tanto conhecimento nas aulas da disciplina AECO.

Aos demais professores do NuPPeN (Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais) por sempre contribuírem com a pesquisa nos ensinamentos aos seus alunos.

Ao Magayver do Instituto de Química da UFU, pelas análises de RMN.

A aluna de iniciação científica Sheila Assunção Silva que me auxiliou no desenvolvimento prático deste trabalho.

Aos alunos Flávia e Rafael do NUPPEN que fizeram diversas análises do CGMS.

Ao Jonh Kenedy pela amizade e constante ajuda nas elucidações e em toda caminhada.

Aos amigos do NuPPeN: Michele, Vanessa, Raul, Gaveni, Marília, Tiara, Tamires, Érica, Karina, pelo companheirismo, amizade e ajuda.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Muñoz, por disponibilizar o potenciómetro para medidas eletroquímicas e deixar disponível o laboratório NUPE, bem como seus alunos sempre dispostos a auxiliar.

Ao aluno Webersson do NUPE que me auxiliou nas análises eletroquímicas

Ao Sinval e Leandro que fizeram as análises de infravermelho.

À FAPEMIG (APQ01392-14 A.O., APQ02481-14 M.P e APQ02342-18 R.M.F.S, CEX-RED00010-14 Rede Mineira), CAPES e CNPq (449846/2014-8 M.P) e pelos incentivos com as bolsas e projetos aprovados.

E por fim, ao Instituto de Química da UFU e aos servidores do Programa de Pós-Graduação em Química, que possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

Embora o lúpulo tenha sido inicialmente usado como conservante na cerveja, esse introduziu amargor e um sabor agradável a ela, razão pela qual foi grande a sua aceitação e assim se substituiu outras matérias-primas antes utilizadas na bebida. O sabor característico se deve tanto ao óleo essencial como as resinas encontradas nas glândulas de lupulina. Os α-ácidos presentes na resinas são de grande interesse na indústria cervejeira. Durante a fervura no processo de obtenção da bebida, os α-ácidos são isomerizados em iso-α-ácidos, conferindo o típico sabor amargo. Esse trabalho teve como propósito sintetizar a molécula 2-acetil-3,5,6-trihidroxi-4,6-dimetilciclohex-2,4-dienona para ser utilizada como padrão analítico na medida do amargor em cervejas, uma vez que esse padrão não é encontrado para venda. Nesse sentido, trata-se de uma alternativa para análise dos α-ácidos, que atualmente possuem custos elevados, e por outro lado para as microcervejarias que estão em plena expansão no Brasil, a análise de α-ácidos seria mais acessível com o uso de técnicas com baixo custo, alta precisão, facilidade e rapidez nos resultados. Até o momento, a molécula não foi totalmente sintetizada, não sendo possível ainda mostrar os resultados obtidos de quantificação do amargor. Entretanto, o trabalho mostra que o extrato de lúpulo, bem como uma cerveja com grau de amargor elevado (IBU: 100), apresentaram fenômeno oxidativo. O lúpulo apresentou potencial de oxidação por voltametria de pulso diferencial em +1,16 V, enquanto que a cerveja em +1,20 V. Essa diferença ocorre pois os α-ácidos são isomerizados a iso-α-ácidos nas cervejas. Através da análise por espectrometria de massas foi possível confirmar essa diferença de composição entre o extrato do lúpulo e a cerveja.

Palavras-chave: α-Ácidos. Lúpulo. IBU. Cerveja. Eletroquímica.

Abstract

Although hops were initially used as a preservative in beer, it introduced bitterness and a pleasant taste to it, which is why its acceptance was great and thus replaced other raw materials previously used in the drink. The characteristic taste is due to essential oils and resins found in the lupulin glands. The α -acids from resins are the most interesting to the brewing industry. During boiling in the process of obtaining the beverage, α -acids are isomerized in iso-alpha-acids, conferring the typical bitter taste. The purpose of this work was to synthesize the 2,4-diacetyl-3,4-dihydroxy-5-methylcyclopent-2-anone molecule to be used how analytical standard in the quantification of hop from beer, since this standard is not found for sale. Therefore, it would be an alternative for the analysis of the α -acids, which currently has a high cost, and on the other hand, the microbreweries are in full expansion in Brazil, the analysis of α -acids would be more accessible to these companies by techniques with low cost, high accuracy and ease and speed in results. So far the molecule has not been fully synthesized. It is not yet possible to show the results obtained from bitter quantification. However, the work shows that hop extract, as well as a beer with a high degree of bitterness (IBU: 100), presented oxidative phenomena. The hops presented oxidation potential by pulse voltammetry at +1.16 V, while beer at +1.20 V. This difference occurs due to the presence of the alpha-acids being isomerized in beers. Through the mass spectrometry analysis it was possible to confirm this difference in composition between the hop extract and the beer.

Keywords: α -Acids. Hop. Bitterness. IBU. Beer. Eletrochemical.

Lista de Figuras

Figura 1:	Esquema simplificado da produção da cerveja.....	19
Figura 2:	Estrutura química dos principais óleos essenciais do lúpulo.....	20
Figura 3:	Isomerização dos α -ácidos em iso- α -ácidos, produzindo compostos <i>cis</i> e <i>trans</i>	21
Figura 4:	Representação da estrutura da glicose, maltose e maltotriose na conformação cadeira.....	24
Figura 5:	Fluxograma representativo da conversão energética de glicose em etanol durante o processo de fermentação.....	25
Figura 6:	Estrutura dos principais flavonoides presentes no lúpulo.....	26
Figura 7:	Estrutura dos β -ácidos.	27
Figura 8:	Plantação de lúpulo em trepadeiras..	28
Figura 9:	Corte transversal de um cone de flor de lúpulo.....	29
Figura 10:	Lúpulo em suas diferentes formas.....	30
Figura 11:	Diferenças estruturais dos três α -ácidos.....	31
Figura 12:	Mecanismo de isomerização de α -ácidos do lúpulo	32
Figura 13:	Célula eletroquímica convencional.....	34
Figura 14:	Molécula análoga ao α -ácido.....	36
Figura 15:	Rota sintética para obter a molécula similar ao α -ácido.....	39
Figura 16:	Reação de obtenção do 2,4-dimetil-1,3,5-trinitrobenzeno (2).....	42
Figura 17:	Reação de obtenção do 2,4-dimetilbenzeno-1,3,5-triol (4).....	43
Figura 18:	Imagen da aparelhagem utilizada no preparo do composto 4 por refluxo e da purificação por coluna cromatográfica.....	44
Figura 19:	Reação de obtenção do 1-(2,4,6 trihidroxi-3,5-dimetilfenil)etanona (5).....	44
Figura 20:	Imagen da aparelhagem utilizada no preparo do composto 5.....	45
Figura 21:	Síntese da 2-acetil-3,5,6-trihidroxi-4,6-dimetilciclohex-2,4-dienona (6).....	46
Figura 22:	Imagen da aparelhagem utilizada no preparo do composto 6.....	46
Figura 23:	Cervejas com diferentes graus de IBU.....	47
Figura 24:	Esquema para obtenção do extrato de lúpulo.....	48
Figura 25:	Célula eletroquímica de polipropileno, visão A, B e C.....	50
Figura 26:	1,3-Dimetil-2,4,5-trinitrobenzeno (2).....	52

Figura 27:	Mecanismo de nitração do <i>m</i> -xileno (1).....	52
Figura 28:	Espectro de infravermelho do composto 2.....	53
Figura 29:	Espectro de massas obtido por GC-EM do composto 2.....	54
Figura 30:	Proposta de fragmentação do composto 2.....	54
Figura 31:	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO) do composto 2.....	55
Figura 32:	Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, DMSO) do composto 2.....	56
Figura 33:	2,4-Dimetilbenzeno-1,3,5-triol (4).....	57
Figura 34:	Espectro de infravermelho do composto 4.....	58
Figura 35:	Espectro de massas obtido por GC-EM do composto 4.....	58
Figura 36:	Proposta de fragmentação do composto 4.....	59
Figura 37:	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO) do composto 4.....	60
Figura 38:	Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, DMSO) do composto 4.....	61
Figura 39:	1-(2,4,6 trihidroxi-3,5-dimetilfenil)etanona (5).....	61
Figura 40:	Espectro de infravermelho do produto da reação de acilação do composto 4.....	62
Figura 41:	Espectro de massas obtido por GC-EM do produto da reação de acilação do composto 4.....	63
Figura 42:	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO) do composto obtido cerveja.....	64
Figura 43:	Espectro de RMN- ¹³ C (400 MHz, DMSO) do produto da reação de acilação do composto 4.....	64
Figura 44:	Reação de acilação do fluoroglucinol (benzeno -1,3,5-triol).....	65
Figura 45:	Figura 45: Espectro de massas obtido por GC-EM da fluoroacetofenona.....	65
Figura 46:	Espectro de RMN- ¹ H (400 MHz, DMSO) da fluoroacetofenona.	66
Figura 47:	Figura 47: Espectro de RMN- ¹³ C (100 MHz, DMSO) da fluoroacetofenona.....	67
Figura 48:	Voltamograma cíclico: respectivamente da adição do lúpulo e da cerveja.....	68
Figura 49:	Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para amostras com concentrações crescentes de extrato de lúpulo e cerveja de 100 IBU.....	69

Figura 50: Voltamograma de adições de cerveja 15, 50 e 100IBU.....	70
Figura 51: Cromatograma (CLAE-EM) de α -ácidos: cervejas PM1 (linha preta), PM2 (linha vermelha) e PM3 (linha verde) e extrato do lúpulo (linha azul).....	71
Figura 52: Moléculas de α -ácidos e iso- α -ácidos identificadas por CLAE-EM nas cervejas e lúpulo.....	72

Lista de tabelas

Tabela 01: Cervejas com diferentes IBU.....	47
Tabela 02: Composição de α -ácido presentes em amostras de cervejas (PM1, PM2, PM3) e extrato de lúpulo.....	73

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATP: Adenosina trifosfato

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CG-EM: Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas

E: Potencial

HPLC: High *performance* liquid chromatography

I: Corrente

IBU: International Bitterness Unit

CLAE-EM: Cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

ROS: Espécies reativas de oxigênio

UV: Ultravioleta

SWV: Voltametria de onda quadrada

DPV: Voltametria de pulso diferencial

TBAP: Perclorato de tributilamônio

TLC: Cromatografia em camada delgada

SWW: Voltametria de onda quadrada

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	HISTÓRIA DA CERVEJA.....	17
1.2	CONSUMO DE CERVEJA.....	18
1.3	PROCESSO DE FABRICAÇÃO DA CERVEJA.....	19
1.3.1	<i>Água</i>	22
1.3.2	<i>Malte</i>	23
1.3.3	<i>Levedura</i>	24
1.3.4	<i>Lúpulo</i>	26
1.3.4.1	Lúpulo: Cultivo.....	27
1.3.4.2	Lúpulo: aspecto botânico.....	29
1.3.4.3	Lúpulo: aspectos químicos e seu uso na cerveja.....	30
1.3.4.4	α-Ácidos.....	31
1.4	CLASSIFICAÇÃO DA CERVEJA.....	32
1.5	ANÁLISE ELETROANALÍTICA DA CERVEJA.....	33
2.	OBJETIVOS.....	36
2.1	OBJETIVO GERAL.....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3.	JUSTIFICATIVA.....	37
4.	PLANEJAMENTO DE SÍNTESE	39
5.	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	40
5.1	REAGENTES.....	40
5.2	EQUIPAMENTOS.....	40
5.3	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	40
5.4	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM).....	41
5.5	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	41
5.6	SÍNTESE.....	41
5.6.1	<i>Preparo do composto 2,4-dimetil-1,3,5-trinitrobenzeno (2)</i>	42
5.6.2	<i>Preparo do composto 2,4-dimetilbenzeno-1,3,5-triol (4)</i>	43
5.6.3	<i>Preparo do composto 1-(2,4,6 triidroxi-3,5-dimetilfenil)etanona (5)</i>	44

5.6.4	<i>Preparo do composto 2-acetyl-3,5,6-trihidroxi-4,6-dimetilciclohex-2,4-dienona (6).....</i>	46
5.7	IDENTIFICAÇÃO DOS A-ÁCIDOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS NAS AMOSTRAS DE CERVEJA E EXTRATO DE LÚPULO.....	47
5.8	INSTRUMENTAÇÃO ELETROQUÍMICA	49
5.8.1	<i>Eletrodos de trabalho e pré tratamento</i>	49
5.8.2	<i>Células eletroquímicas</i>	50
5.8.3	<i>Eletrólito.....</i>	51
5.8.4	<i>Preparo das amostras para análise eletroquímicas.....</i>	51
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
6.1	TENTATIVA DE SÍNTESE DO COMPOSTO ANÁLOGO AO α -ÁCIDO.....	52
6.1.1	<i>1,3-Dimetil-2,4,5-trinitrobenzeno (2).....</i>	52
6.1.2	<i>2,4-Dimetilbenzeno-1,3,5-triol (4).....</i>	57
6.1.3	<i>1-(2,4,6-Trihidroxi-3,5-dimetilfenil)etanona (5).....</i>	61
6.2	ANÁLISES ELETROQUÍMICAS.....	67
6.3	ANÁLISE DAS CERVEJAS E EXTRATO DE LÚPULO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-EM).....	70
7.	CONCLUSÕES.....	75
	REFERÊNCIAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA DA CERVEJA

A história da cerveja é intrínseca a história da humanidade. Segundo historiadores, o homem pré-histórico deixou a vida nômade ao desenvolver técnicas de agricultura e começar a cultivar grãos, surgindo assim, os primeiros campos de cultura de cereais na Ásia Ocidental, por volta de 9000 a.C. Esses povos se fixaram em grupos com o objetivo do cultivo de cereais diversos como sorgo, cevada e trigo, o que posteriormente levou a produção de alimentos e bebidas oriundos desses (MORADO, 2009).

Nos séculos II e III d.C., após sair da região da mesopotâmia, a cerveja primitiva chegou ao Egito e posteriormente a Europa, onde foi melhorada sensorialmente, em grande parte devido aos esforços de monges da época (os mosteiros eram um dos poucos lugares de conhecimento e desenvolvimento) (MORADO 2009; VENTURINI-FILHO, 2016). Os religiosos se tornaram de fato os primeiros pesquisadores de cerveja, aprimorando seu método de fabricação e conservação (a frio) da bebida, o que levou a uma produção em maior escala, a partir do século VI (EßLINGER, 2009).

O início do uso do lúpulo na produção da cerveja data do século IX. Na época não se sabia muito bem os efeitos desse ingrediente na bebida, porém hoje sabe-se que além do seu amargor típico ele possui propriedades de conservação. (BAMFORTH, 2009). Assim, na época, ao contrário de outras bebidas, a cerveja não se deteriorava facilmente (devido ação de microorganismos), sendo um produto muito aceito e apreciado (BRIGGS et al., 2004).

Durante a revolução industrial do século XIX, a cerveja teve um grande ápice, passando a ser produzida em larga escala e com um maior controle de fabricação nos processos de produção, devido os adventos científicos e tecnológicos como a invenção da máquina a vapor, melhoria de sistemas de refrigeração e meios de transporte. Tais fatores fizeram a cerveja passar de uma atividade doméstica a uma industrial (VENTURINI-FILHO, 2016).

Por volta de 1400, o lúpulo já era bastante difundido na Alemanha, e apesar de algumas resistências, ele finalmente se impôs como conservante e aromatizante, em

contraposição à grande variedade de ervas, flores, frutas, raízes, cascas e até hortaliças adicionadas à bebida na época (BRIGGS et al., 2004).

No Brasil a cerveja fora trazida pela companhia das Índias Orientais, no século XVIII, junto com os holandeses e passou a ser conhecida, mas não tão consumida, ficando bem atrás da cachaça que era a bebida mais popular na época. Tal limitação ocorreu devido ao custo necessário para produção de cerveja em um país tropical: as máquinas a vapor para refrigeração eram raras e caras. Assim, só em 1888 surgiram as duas grandes cervejarias que fariam história no Brasil: A Cia. Cervejaria Brahma e a Cia. Antarctica Paulista. Em 1999 com a fusão das Cia. Brahma e Antarctica, surge a Ambev – Companhia de bebidas das Américas. A criação da Ambev e a sua posterior fusão com a empresa belga Interbrew foram os dois fatos mais marcantes da história da cerveja brasileira. Com o nome InBev, a nova empresa mundial tornou-se a maior produtora do mundo de cerveja (VENTURINI-FILHO, 2016)

1.2 CONSUMO DE CERVEJA

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas mundialmente, sendo a China e os Estados Unidos os líderes de produção. Entretanto a República Tcheca é o país com maior consumo per capita (BAMFORTH, 2009).

O Brasil, por sua vez, se situa como o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, com uma produção anual de 14 bilhões de litros em 2017, gerando um faturamento de 107 bilhões de reais nesse ano. Já em relação ao consumo per capita, o país não se situa em uma posição elevada, ficando em 27º colocado. Apesar disso, a cerveja no Brasil é a preferida por 59% dos brasileiros entrevistados em um estudo realizado pelo Ibope Inteligência (CERVBRASIL, 2018).

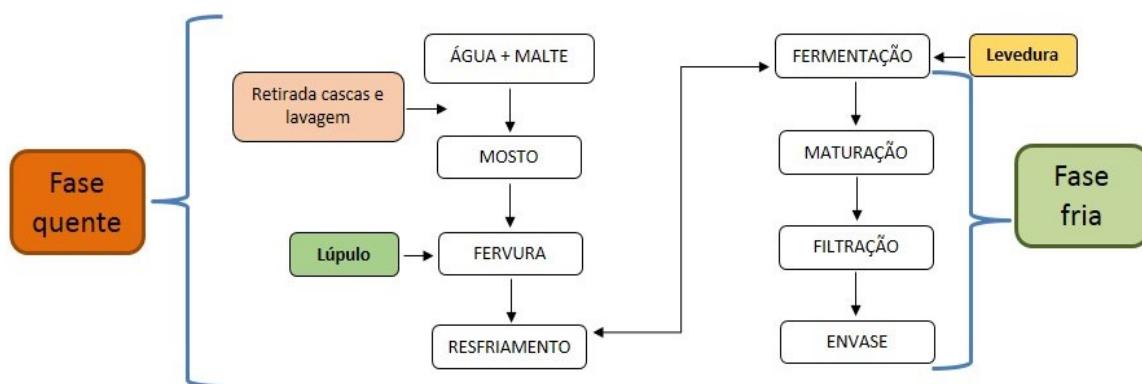
O setor de cervejaria no Brasil movimenta a economia com valores impactantes: a cada R\$1,00 investido no setor são gerados R\$2,50 na economia; o setor gera 21 bilhões de reais de impostos ao ano e 2,7 milhões de empregos, havendo em todo o país 1,2 milhões de postos de venda (CERVBRASIL, 2018).

1.3 PROCESSO DE FABRICAÇÃO DA CERVEJA

Hoje, segundo o Decreto 6.871, de 2009 da Lei nº 8.918, de 1994, a cerveja é definida como uma bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo (BRASIL, 2009).

O processo de produção de cerveja pode ser dividido basicamente nas seguintes etapas (conforme ilustrado pela Figura 1: 1) moagem dos grãos; 2) mistura desse com água; 3) fervura (nessa é adicionado o lúpulo); 4) Resfriamento; 5) Fermentação (adiciona-se a levedura); 6) maturação; 8) filtração; 9) envase e 10) pasteurização (opcional). As etapas de 2 a 4 compreende a fase quente do processo com menor risco de contaminação. As etapas de 5 a 10 são as fases frias, sendo extremamente importante o controle da contaminação nessas etapas (EBLINGER, 2009).

Figura 1: Esquema simplificado da produção da cerveja.



Fonte: a autora.

A brassagem inclui as etapas de 1 a 4 do processo produtivo. Ela se inicia com a adição do “grist” de maltes moídos (e adjuntos, caso sejam utilizados) à água. A mistura é então aquecida as temperaturas em torno de 50°C a 70°C (os valores variam de acordo com o estilo da cerveja e a levedura utilizada) com intuito de se obter o mosto, que é um caldo rico em açúcares fermentáveis como glicose, maltose e maltotriose, açúcares não fermentáveis (dextrinas) e outros compostos secundários tais

como aminoácidos e minerais importantes para o metabolismo da levedura, retenção de espuma, dentre outros (ESTRACANHOLLI, 2012).

A mistura da água com o malte recebe o nome de mosto, no momento da fervura o lúpulo é adicionado, e após 60 minutos, em média ocorre o resfriamento, a etapa seguinte que é de fermentação requer baixas temperaturas para ocorrer: as leveduras quebram as moléculas de glicose produzindo CO₂ e etanol, que são desejáveis para indústria cervejeira.

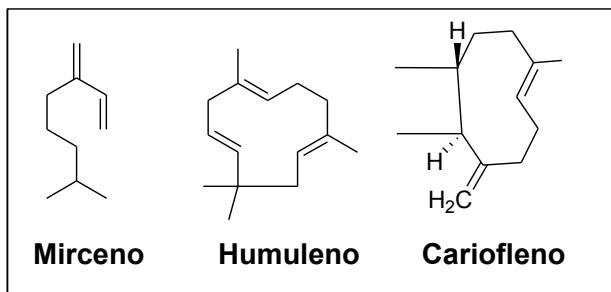
A transformação mais importante que ocorre durante a mostura é a do amido em açúcares fermentáveis pelas enzimas β-amilases do malte. A melhor temperatura para a atividade enzimática das β-amilases é de 62 ± 2 °C. Outras rampas de temperaturas podem ser usadas com ação de outras enzimas, como as proteases próximo à 50 °C e as α-amilases (que geram açúcares não fermentáveis) próximo à 70 °C (BAMFORTH, 2009).

Durante o processo de fermentação do amido do malte, outros produtos, além de açúcares, são produzidos como alcoóis de cadeias maiores, ésteres e alguns ácidos. Na etapa seguinte, a maturação, ocorre a degradação desses subprodutos (ESTRACANHOLLI, 2012).

A cerveja é então filtrada para retirada de polifenóis, uma vez que sua presença poderia turvar a bebida, assim ela fica mais límpida e com aspecto mais desejável. O último processo após o envase é a pasteurização da cerveja. Essa última etapa não ocorre com o chopp (BRIGGS et al., 2004).

Vale destacar que, durante a fervura, ocorre à dissolução de componentes do lúpulo como os óleos essenciais (já foram identificados mais de 300 compostos voláteis no lúpulo), dentre esses se pode destacar mirceno, humuleno, e cariofleno, cujas estruturas estão representadas abaixo (ALMAGUER et al., 2014).

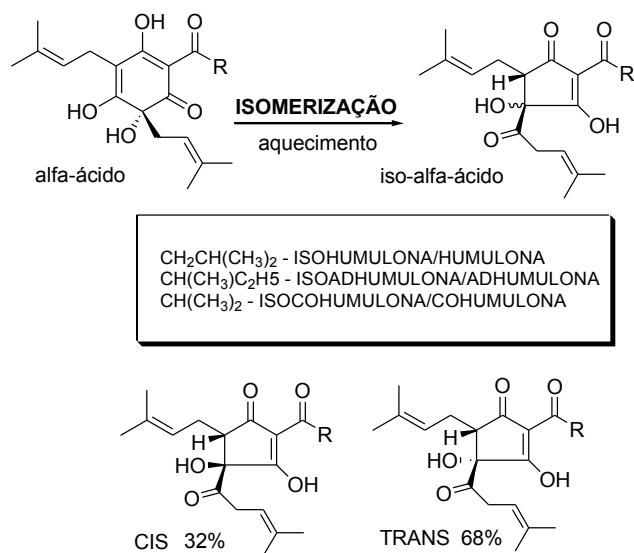
Figura 2: Estrutura química dos principais óleos essenciais do lúpulo.



Fonte: a autora.

Além disso, nesta etapa de fervura ocorre a transformação dos α-ácidos (também conhecidos como humulonas) em iso-α-ácidos (isomerização). A extensão dessa isomerização é a responsável pelo amargor da cerveja. O tempo de fervura geralmente é de 60 minutos, pois a partir desse tempo a isomerização já não ocorre de forma significativa e consequentemente não há aumento no amargor (KAPPLER et al., 2010). As etapas e mecanismos envolvidos na isomerização serão discutidos posteriormente.

Figura 3: Isomerização dos α-ácido em iso-α-ácido, produzindo compostos *cis* e *trans*.



Fonte: a autora.

Em seguida ocorre a fase fria do processo, com o resfriamento do mosto em trocadores de calor e sua posterior aeração, com injeção forçada de oxigênio, possibilitando assim a condição ideal para que às leveduras realizem a fermentação (EßLINGER, 2004). O nível de oxigênio ideal no mosto resfriado é de 8 a 12 mg L⁻¹. Esse é o único momento em que o oxigênio é desejável na cerveja, em todas as outras etapas deve-se evitar a entrada de oxigênio no produto (REINOLD, 1997). Durante a fermentação, as leveduras consomem os açúcares fermentáveis, produzindo CO₂ e etanol como produtos principais, além de alcoóis de cadeias maiores, ésteres e alguns ácidos como produtos secundários (VENTURINI-FILHO, 2016).

Ao final da fermentação, a temperatura da cerveja é reduzida para que ocorra a decantação de grande parte da levedura, a qual é posteriormente purgada para o tanque cilindro cônicoo, no qual se iniciará a maturação. Nessa fase ainda ocorre

algumas transformações com algumas leveduras e carboidratos remanescentes (fermentação secundária), o que causa um aprimoramento no sabor final da cerveja. O prazo de maturação varia de 6 a 30 dias (varia de acordo com o tipo de fermentação e estilo de cerveja, principalmente). Ao final desse processo a cerveja já está com aroma e sabor definidos (BRIGGS et al., 2004).

O processo seguinte é o da clarificação que ocorre pela retirada de materiais remanescentes na cerveja, deixando-a mais límpida. As quatro técnicas básicas de clarificação que podem ser usadas, tanto individualmente como em combinação são: sedimentação por gravidade, uso de agentes clarificantes, centrifugação e filtração (VENTURINI-FILHO, 2016).

Por fim a cerveja é envasa em barris ou em garrafas e fica disponibilizada para ser pasteurizada. Caso não haja a pasteurização, a cerveja é denominada Chopp (DECRETO 6.871, de 2009).

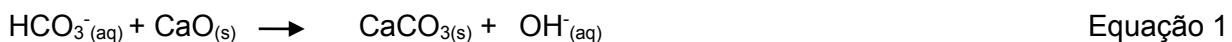
A cerveja tem como ingredientes básicos: cevada maltada, água, levedura e lúpulo. No entanto, a legislação brasileira permite que parte do malte de cevada seja substituída por cereais maltados ou não, e por carboidratos de origem vegetal, transformados ou não, conhecidos como adjuntos (VENTURINI-FILHO, 2016). Assim, o aspecto da cerveja dependerá das características desses ingredientes adicionados a ela (BAMFORTH, 2003).

1.3.1 Água

O percentual de água na cerveja varia de 92 a 95%, sendo o ingrediente em maior quantidade. Portanto, a sua composição em relação à quantidade de sais dissolvidos e à matéria orgânica presente, causa grande impacto no sabor final do produto. Os locais que possuem água com relativa uniformidade, além de qualidade e abundância, é um fator crucial para as cervejarias decidirem o local onde se estabelecer (JASKULA et al., 2008; BRIGGS, 2004). A água utilizada nas cervejarias geralmente passa por um tratamento para se encaixar nos parâmetros físico-químicos e microbiológicos. Águas de baixa qualidade podem ter um custo de tratamento final muito alto, inviabilizando o negócio (BRIGGS et al., 2004).

Alguns sais desempenham um papel único na cerveja, como exemplo o cálcio que protege a enzima amilase da desativação térmica durante a hidrólise do amido

bem como precipita o oxalato (CaC_2O_4), evitando assim a posterior turvação da bebida (BAMFORTH, 2003). O magnésio, que é essencial ao funcionamento de certas enzimas da levedura, pode conferir amargor a bebida quando em níveis mais elevados que 30 mg L^{-1} . Quando a alcalinidade e a dureza da água estão altas é necessário um tratamento à base de óxido de cálcio. Este reage com os hidrogenocarbonatos de cálcio e de magnésio que compõem a dureza da água, formando carbonato de cálcio, que é filtrado (equação 1) (KEUKELEIRE, 2000).



O zinco também ativa a síntese de proteínas, estimulando o crescimento das leveduras (ativando a fermentação), já os cloretos de cálcio e magnésio conferem a cerveja um paladar mais encorpado, porém se a concentração estiver acima de 100 mg L^{-1} pode ocorrer corrosão dos equipamentos da linha de produção (REINOLD, 1997).

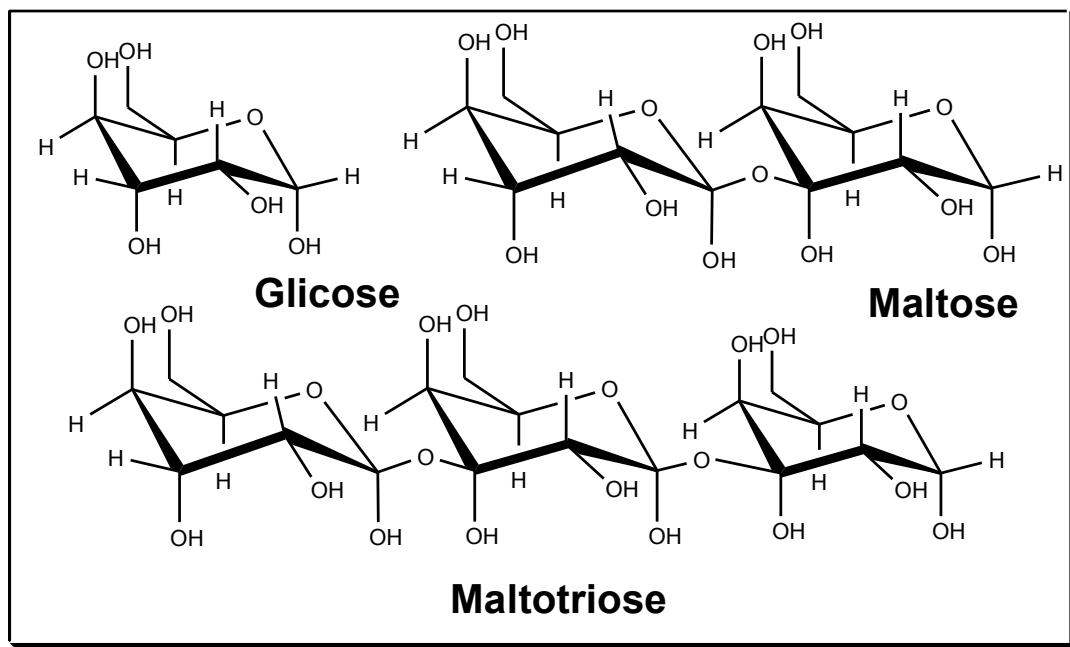
1.3.2 Malte

Malte é a matéria-prima resultante da germinação, sob condições controladas de qualquer cereal (cevada, arroz, milho, trigo, sorgo, aveia, etc.). A princípio, qualquer cereal pode ser malteado, considerando o seu valor econômico e o seu poder diastático, que nada mais é que a quantidade de enzimas presentes no malte. Um malte com alto poder diastático tem uma maior capacidade em quebrar seus açucares complexos (VENTURINI-FILHO, 2016).

O malte mais utilizado na produção de cerveja é a cevada. Além desse grão, outros como milho e arroz podem ser utilizados, e assim recebem o nome de adjuntos, sendo que a legislação de muitos países permite a adição de adjuntos à bebida. Para a escolha de adjuntos, alguns fatores devem ser levados em conta como: valor econômico, disponibilidade e teor de amido (AIZEMBERG, 2015). Cervejas com adjuntos em sua composição se tornam mais leves e atendem melhor a demanda do mercado; Desses, o mais utilizado no mercado cervejeiro nacional é o milho (VENTURINI-FILHO, 2016).

No processo de produção da cerveja o malte é misturado à água (e passa a receber o nome de mosto) e em seguida ocorre a mosturação: as enzimas α -amilases e β -amilases quebram as ligações glicosídicas do amido, mediante um aquecimento gradativo, em açúcares menores (AIZEMBERG, 2015). Esses podem ser divididos em: açúcares fermentáveis (como a glicose, maltose e maltotriose), mostrados na Figura 4, e açúcares não fermentáveis, as dextrinas e os β -glucanos (ESTRACANHOLLI, 2012).

Figura 4: Representação da estrutura da glicose, maltose e maltotriose na conformação cadeira.



Fonte: a autora.

1.3.3 Levedura

Apesar de Louis Pasteur ser popularmente associado ao processo de pasteurização do leite, ele foi durante muitos anos consultor de muitas cervejarias e na verdade, suas primeiras pesquisas foram direcionadas à cerveja, como consta em seu documento “*Estudos sobre a cerveja*” de 1876. Já Gay Lussac direcionou alguns trabalhos em fórmulas de fermentação e Emil Christian Hansen isolou as primeiras culturas puras de leveduras, iniciando sua produção controlada, na cervejaria Carlsberg. Foi a partir desse ponto que a cerveja começou a ganhar estabilidade

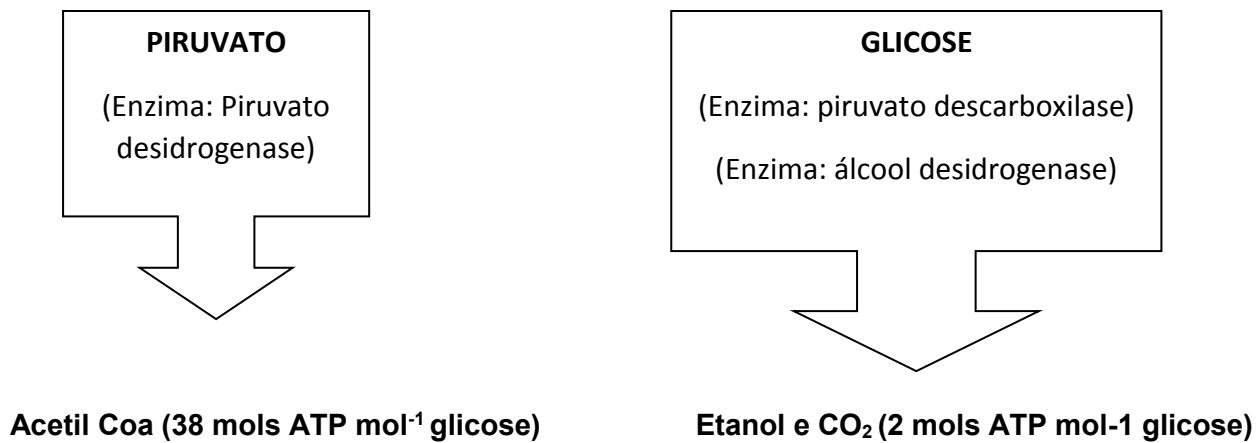
organoléptica e a ser comercializada em muitos outros países do mundo (MORADO, 2009).

É pela ação das leveduras que o malte (na forma de mosto) é transformado em cerveja. Diferentes tipos de leveduras produzem quantidades e qualidades diferentes de vários compostos, quando fermentam um mosto com características idênticas (AIZEMBERG, 2015). Elas apresentam uma complexa e intricada rede de vias metabólicas responsáveis pela degradação de alguns compostos químicos e síntese de outros. A principal delas é a conversão de carboidratos assimiláveis (mono, di e tri sacarídeos, como glicose, maltose e maltotriose, respectivamente) em etanol e CO₂ (EßLINGER, 2009).

Além disso, há a formação de outras substâncias (principalmente ésteres e álcoois de cadeias maiores) que formam a base dos aromas e sabores da cerveja. O metabolismo aeróbico das leveduras segue a rota metabólica através da produção do piruvato (VENTURINI-FILHO, 2016).

Pela ação da enzima piruvato desidrogenase o piruvato é convertido em acetil-CoA, com geração de 38 mols ATP mol⁻¹ de glicose. No entanto, a principal via utilizada pelas leveduras é a anaeróbica, na qual há a conversão da glicose em etanol e CO₂, com um balanço energético de 2 mols ATP mol⁻¹ glicose. Nesta via o receptor de hidrogênio é o acetaldeído, e a glicose converte-se em piruvato. Primeiro a enzima piruvato descarboxilase produz CO₂ e acetaldeído, e em seguida a enzima álcool desidrogenase converte acetaldeído em etanol (PINTO, 2018).

Figura 5: Fluxograma representativo da conversão energética de glicose em etanol durante o processo de fermentação.



Fonte: a autora.

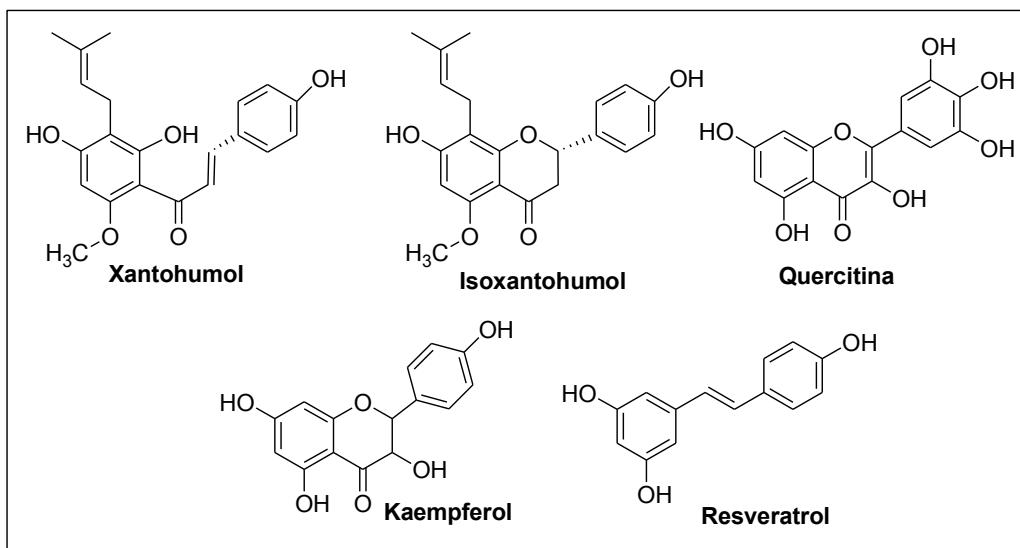
1.3.4 Lúpulo

O lúpulo e seus componentes são considerados essenciais na produção da cerveja e responsáveis pela distinção desta de qualquer outra bebida carbonatada, tornando o lúpulo uma matéria-prima essencial e indispensável nas cervejarias (VENTURINI-FILHO, 2016).

O lúpulo comercial é definido de acordo com o decreto 6.871 de 2009 como os cones das inflorescências em sua forma natural ou industrializada, aptos para o consumo humano (BRASIL, 2009).

O estudo da química do lúpulo é relevante para muito além da cerveja. O lúpulo só começou a ser estudado a partir do século XIX e mesmo assim trabalhos de grandes relevâncias já mostraram que muitas substâncias no lúpulo podem ajudar na saúde. Assim, os flavonoides de maior destaque presente no lúpulo são: xanthohumol, isoxanthohumol, quercitina, kaempferol e resveratrol (Figura 6). A única planta até hoje estudada que tem como flavonoide o xantohumol é o lúpulo (VANHOECKE et al., 2005).

Figura 6: Estrutura dos principais flavonoides presentes no lúpulo.



Fonte: a autora.

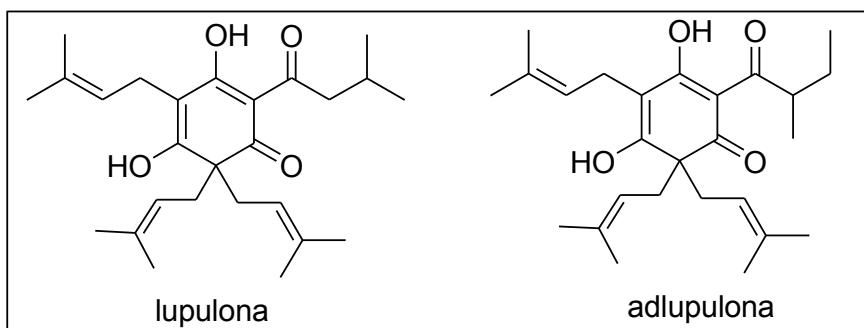
Devido a essas substâncias, o lúpulo tem efeito sedativo, diurético e propriedades antibacterianas. Ele também afeta positivamente o sistema nervoso, combatendo a tensão, eliminando estados de ansiedade e melhorando o bem-estar,

além de ser usado no tratamento de sintomas da menopausa. Há ainda, estudos relacionando o lúpulo no combate a obesidade, uma vez que ele inibiria a ação de enzimas digestivas como a α -amilase, α -glicosidase, lipase e tripsina (MARQUES et al., 2014), reduzindo a absorção de carboidratos e lipídeos.

Especial atenção tem sido dedicada à oxidantes e espécies reativas de oxigênio (ROS), que têm efeitos destrutivos sobre células e tecidos. O uso comercial disseminado do lúpulo e o fato dele ter sido freqüentemente mencionado como uma fonte valiosa de antioxidantes naturais contribuíram para o interesse nessa matéria-prima, bem como estudos do tema (VANHOECKE et al., 2005).

Outros componentes do lúpulo são os β -ácidos (representados na Figura 7), que não sofrem isomerização térmica no processo de infusão e não adicionam amargor substancial à cerveja, os quais possuem estudos relacionados ao combate à doença de Alzheimer (SASAOKA et al., 2014).

Figura 7: Estrutura dos β -ácidos.



Fonte: a autora.

Os β -ácidos, ao contrário dos alfa ácidos não sofrem isomerização pois possuem duas cadeias carbônicas alfa ao carbono carbonílico impedindo a isomerização nesse caso.

1.3.4.1 Lúpulo: cultivo

O lúpulo cultivado se destina sobretudo à utilização na indústria cervejeira. Uma pequena quantidade é utilizada como planta medicinal, sendo incorporada em medicamentos recomendados para insônia, estresse e ansiedade (NEGRI et al., 2010).

Às vezes, os brotos das raízes são colhidos para culinária como uma iguaria, apresentando um gosto semelhante ao aspargo (ALMAGUER et al., 2014).

O lúpulo utilizado na fabricação de cerveja tem idade econômica de cultivo superior a 20 anos e é natural de muitas zonas temperadas da Europa, dos Estados Unidos e da China (ALMAGUER et al., 2014). Uma das razões pelas quais apenas algumas regiões cultivam o lúpulo, é que ele precisa de 13 horas de luz solar para florescer, por isso no Brasil o cultivo é dificultado (mas não inviabilizado), já que o nosso país não se encontra na latitude que oferece esse tempo de luz solar. Outro fator importante para o cultivo é o clima, devido as exigências de certos controles de temperatura e umidade (BAMFORTH, 2003).

Visto que o lúpulo é uma trepadeira, conforme representado na Figura 8, com comprimento do caule em torno de 6 a 10 m, para o seu cultivo coloca-se, geralmente, um suporte adequado que serve de apoio para o crescimento (ALMAGUER et al., 2014). Assim, a composição do lúpulo depende da variedade, safra, procedência, tempo de colheita, secagem e armazenamento (EßLINGER, 2009).

No momento de sua colheita, o lúpulo apresenta um teor de água de 80%, sendo inviável seu armazenamento imediato. Sendo assim, o lúpulo é secado em estufa para redução do teor de umidade (para aproximadamente 10%) e passa por um processo posterior de beneficiamento, onde é transformado em pó ou pellets para fins de comercialização (BRIGGS et al., 2004).

Figura 8: Plantação de lúpulo em trepadeiras.



Fonte: https://www.acasadocervejeiro.com.br/plantar_Lupulo.

1.3.4.2 Lúpulo: aspecto botânico

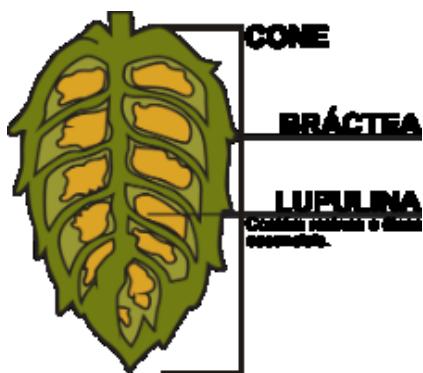
O lúpulo é uma planta trepadeira cujo nome da espécie é *Humulus lupulus L.*, pertencente à família das Cannabinaceas. Embora seja uma planta diótica, somente as fêmeas são capazes de conferir o amargor e uma variedade de sabores e aromas a cerveja (BRIGGS et al., 2004).

As folhas crescem em pares opostos de nós na videira principal. A maioria das folhas tem três ou cinco lobos. Às vezes, folhas de três e cinco lóbulos ocorrem na mesma planta. As folhas de coloração verde a marrom-amarelada são peludas dos dois lados e podem atingir até 20 cm de comprimento (KEUKELEIRE, 2000).

A planta possui na sua parte subterrânea uma estrutura perene, composta de raízes que podem atingir elevada profundidade, e ainda, apresenta caules trepadores (sarmentos) que crescem até 8 metros de altura em 3 meses (EßLINGER, 2009).

A flor do lúpulo, representada na Figura 9, tem o formato de um pequeno cone verde, onde se encontra, na base das pétalas, as glândulas que produzem a lupulina, um pó resinoso em que se concentra a maior parte das propriedades desejadas na fabricação da cerveja (VENTURINI-FILHO, 2016). Nessas glândulas se encontram as resinas compostas principalmente de α-ácidos, óleos essenciais e polifenóis, além de outras substâncias. As duas primeiras são de longe os compostos mais importantes para o processo cervejeiro (ALMAGUER et al., 2014).

Figura 9: Corte transversal de um cone de flor de lúpulo.

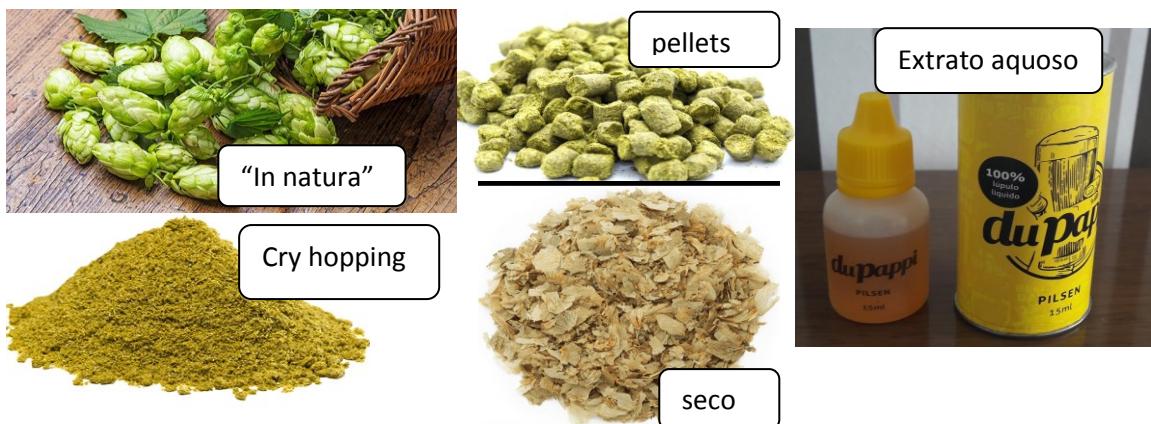


Fonte: <http://www.quimicavolatil.com.br/2010/10/lupulo-o-sabor-satisfatorio-da-cerveja.html>.

1.3.4.3 Lúpulo: aspecto químico e seu uso na cerveja

Através dos tempos, o uso de lúpulo ganhou aceitação gradualmente na fabricação de cerveja. Entretanto, atualmente o lúpulo *in natura* quase não é utilizado, então quase toda a cerveja é tratada com lúpulo processado seja na forma de sua flor seca (desidratada), pó conhecido como *cry hops*, e pellets e outros produtos derivados do lúpulo (como extratos de óleos essenciais ou de α-ácidos) (Figura 10). O número de bebidas fermentadas conhecidas hoje em todo o mundo é vasto, assim, o lúpulo dá à cerveja o seu sabor característico, colocando-a à parte de todas as outras bebidas (ALMAGUER et al., 2014). É notório que há uma tendência atual por apreciação de cervejas mais amargas, com maior dosagem de lúpulo, o que aumenta ainda mais o consumo desse ingrediente (REINOLD, 1997).

Figura 10: Lúpulo em suas diferentes formas.



Fonte: <http://cervejaemalte.com.br/blog/o-que-o-lupulo-faz-na-cerveja/> e foto a autora.

O lúpulo é um dos insumos mais caros na produção da cerveja. Eles se diferem em lúpulos de amargor, aroma e de amargor e aroma (duplo propósito) (EßLINGER, 2009). Há várias formas de adição do lúpulo na bebida, podendo ser adicionados de uma só vez, ou em vários momentos da etapa da fervura, atribuindo assim sabor, aroma e também propriedades antimicrobianas (JASKULA et al., 2008).

Os lúpulos utilizados para dar amargor na cerveja são pobres em óleos essenciais, mas, por outro lado são ricos em α-ácidos e consequentemente são adicionados em tempos maiores de fervura para trazer amargor na cerveja. Os lúpulos de aroma são adicionados ao final da etapa de fervura, e apresentam baixa quantidade

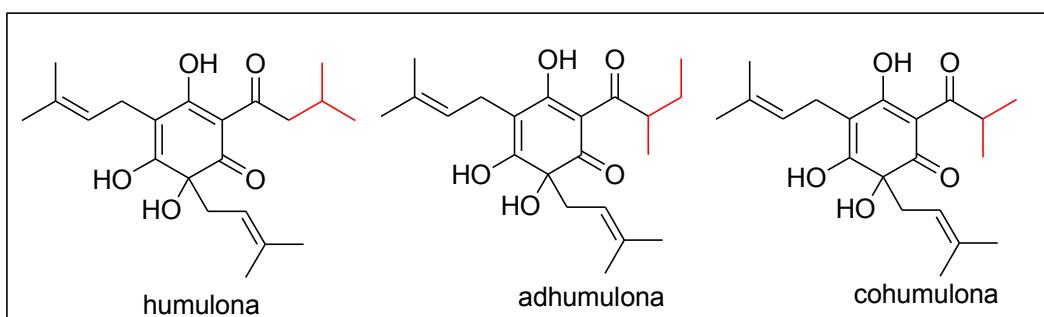
de α -ácidos, mas, possuem grande quantidade de óleos essenciais, os quais conferem aromas únicos na cerveja (VERZELE; KEUKELEIRE, 1991). Os lúpulos de duplo propósito possuem tanto um alto teor de α -ácidos, quanto uma grande concentração de compostos aromáticos finos e, portanto, são utilizados para ambos os propósitos (JASKULA et al., 2008).

Das diversas classes de compostos químicos presentes na lupulina, os α -ácidos estão presentes de 3 a 15% e os óleos essenciais de 0,5 a 2%, o restante da sua composição é água (8 a 14%); proteínas (12 a 24%); resinas totais (12 a 21%); β -ácidos (3 a 6%); taninos (2 a 6%); celulose (10 a 17%); e cinzas (7 a 10%) (KEUKELEIRE, 2000).

1.3.4.4 α -Ácidos

Os α -ácidos são representados por uma mistura de vários homólogos, com três análogos principais: humulona, adhumulona e cohumulona (Figura 11).

Figura 11: Diferenças estruturais dos três α -ácidos.



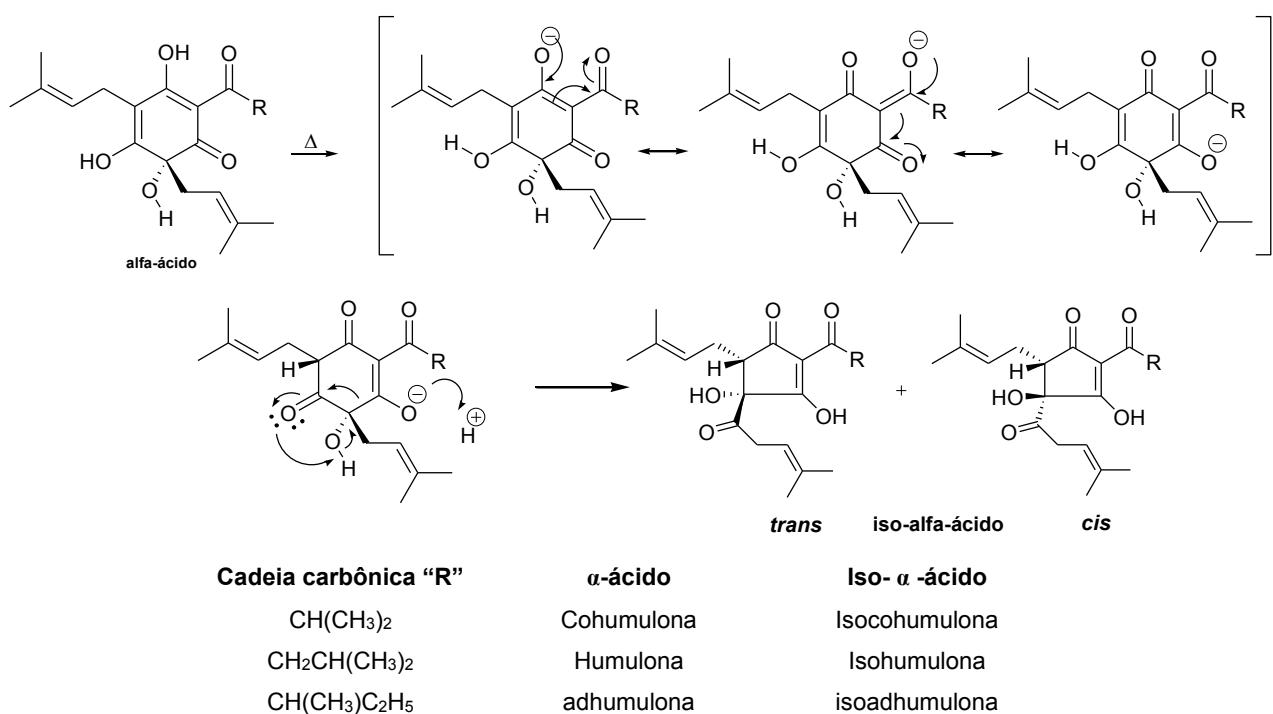
Fonte: a autora.

As moléculas dos α -ácidos, quando isomerizadas (etapa da fervura) conferem o amargor típico da bebida, os β -ácidos por outro lado, não possuem a propriedade de dar amargor a bebida, pois não isomerizam e não solubilizam no mosto (CABALLERO et al., 2012; PINTO, 2018). As moléculas dos α -ácidos foram descoberta por Lintner e Schnell em 1904, e sua purificação foi descrita por Wollmer, que conseguiu obter um derivado cristalino dos α -ácidos por reação com 1,2-diaminobenzeno (KEUKELEIRE; VERZELE, 1991).

É possível separar quimicamente os α -ácidos, através da precipitação quando se adiciona acetato de chumbo (II), formando assim sais de chumbo de cor amarelada, o que não ocorre com os β -ácidos. Nos α -ácidos a estrutura presente na molécula de álcool terciário forma um complexo com o chumbo com a coloração amarela (KEUKELEIRE; VERZELE, 1991).

A conversão química dos α -ácidos nos iso- α -ácidos ocorre durante a etapa de fervura do mosto. Essa isomerização térmica ocorre por um tipo de contração do anel (Figura 12) aumentando assim a solubilidade desses ácidos no mosto cervejeiro. Os β -ácidos, por sua vez, possuem baixa solubilidade no mosto e na cerveja, por isso contribuem muito pouco para o seu amargor (PINTO, 2018; JASKUZA et al., 2008).

Figura 12: Mecanismo de isomerização de α -ácidos do lúpulo.



Fonte: Adaptado de Jaskula et al. (2008).

1.4 CLASSIFICAÇÃO DA CERVEJA

As cervejas podem ser divididas de acordo com a fermentação, em três famílias: larger (com levedura de baixa fermentação), Ale (com levedura de alta fermentação) e Lambic de fermentação espontânea (KEUKELEIRE, 2000).

Depois são subdivididas em estilos, entre eles os principais:

- Pilsen: o tipo mais consumido no mundo, é clara, com baixo corpo, baixo teor alcoólico, levemente amarga e com final seco;
- American Lager: cervejas mais comerciais, com alta “drinkability”, (fáceis de beber), pouco amargor, baixo teor alcoólico e geralmente coloração dourada;
- Weizenbier: Cerveja de trigo dividida em dois tipos: Hefe-Weizenbier (não filtrada) e Kristalweizen (versão filtrada e cristalina). Bebida muito refrescante com aromas fenólicos de cravo que lembram banana, cor pode variar de amarelo palha para dourado escuro, com colarinho branco grosso e consistente. Corpo leve, sabor condimentado e frutado.
- IPA (India Pale Ale): Estilo de cerveja dividido em três tipos: American IPA, English IPA e Imperial IPA. As duas primeiras tem aromas cítricos e colarinho persistente, enquanto a terceira é bem mais amarga. Teor alcoólico médio.

De acordo com a Lei Nº 8.918, de 14 de julho de 1994 - Art. 39, a cerveja poderá ser denominada: Pilsen, Export, Lager, Dortmunder, Munchen, Bock, Malzbier, Ale, Stout, Porter, Weissbier, Alt e outras denominações internacionalmente reconhecidas que vierem a ser criadas, observadas as características do produto original.

1.5 ANÁLISE ELETROANALÍTICA DA CERVEJA

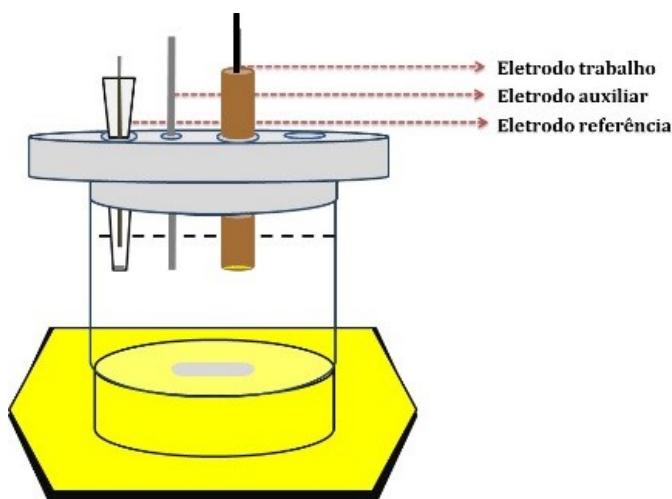
A eletroanalítica abrange uma diversidade de aplicações com estudos sistemas complexos, onde ocorrem simultaneamente ou consecutivamente diversas reações no eletrodo. Nesta perspectiva está o desenvolvimento de novos materiais de eletrodo, ou modificadores com o intuito de aumentar a seletividade, sensibilidade e reproduzibilidade de sensores potenciométricos, amperométricos e voltamétricos (BRETT; BRETT, 1993).

Nas técnicas voltamétricas, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar durante a varredura, onde a diferença ocorre entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. Assim, o parâmetro ajustado é o potencial e o parâmetro monitorado é a corrente resultante. O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma na qual a magnitude da corrente oriunda da transferência de elétrons na interface eletrodo/solução está relacionada com a

quantidade de analito presente na célula eletroquímica, e o potencial no qual ocorre esta reação redox fornece uma informação qualitativa. Obviamente existe a necessidade do analito ser eletroativo, ou seja capaz de ser submetido à reação redox na superfície do eletrodo de trabalho na janela de potencial estudada (PACHECO et al., 2013).

Nesse âmbito, as técnicas voltamétricas são uma boa alternativa para muitas aplicações em química analítica, seja no controle de qualidade de produtos farmacêuticos, alimentícios, aplicações ambientais, análise de combustíveis, entre outras. Essas técnicas voltamétricas se baseiam nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície (Camada de Nert). São classificadas como dinâmicas, pois a célula eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica que, por sua vez, é medida em função da aplicação de um potencial controlado. A célula eletroquímica mais comum em voltametria é composta por três eletrodos (Figura 13) (PACHECO et al., 2013).

Figura 13: Célula eletroquímica convencional.



Fonte: autora.

Os eletrólitos suporte são escolhidos para assegurar a condutividade elétrica do meio, garantir força iônica adequada e constante, controle de pH (no caso de sistemas tamponados), e ainda outras propriedades importantes afetadas pelo eletrólito como viscosidade, densidade e tensão superficial do meio reacional (PACHECO et al., 2013).

Na literatura verifica-se que a voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial, juntamente com a espectrofotometria UV-VIS e FTIR foram usadas com sucesso para determinar o conteúdo de compostos fenólicos e seus derivados no lúpulo usando vários testes antioxidantes. As medidas eletroanalíticas realizadas com voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, através do potencial de meia onda, permitiram a determinação precisa da capacidade antioxidant dos compostos presentes em extratos de lúpulo e ainda correlacionam a capacidade antioxidant dos extratos de lúpulo com o seu método de processamento (MASEK et al., 2014). Em outro trabalho, as propriedades antioxidantes do lúpulo comercial e do malte de cevada foram avaliadas por métodos eletroanalíticos, com emprego do índice eletroquímico, e comparadas com métodos espectrofotométricos, mostrando que ferramentas eletroanalíticas são práticas e fáceis de avaliar as propriedades antioxidantes das amostras de lúpulo e malte, de forma a contribuir para a seleção de matéria-prima para fabricação de cerveja e, portanto, com a qualidade de uma das bebidas mais consumidas no mundo (OLIVEIRA NETO, 2017).

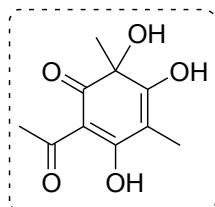
As línguas eletrônicas são tecnologias analíticas emergentes, que simulam a detecção gustativa da língua humana por meio de sensores eletroquímicos ou arranjos de biosensorres (ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2015). Uma língua eletrônica potenciométrica, composta de eletrodos seletivos a sódio, cálcio, amônia e um eletrodo seletivo de ânions, foi usada para analisar 34 amostras de cerveja e foi capaz de discriminar cervejas de diferentes marcas e tipos, em associação com a análise quimiométrica. O sistema ainda foi capaz de prever o pH e em parte também o teor de álcool das cervejas testadas, indicar a presença de estabilizantes, antioxidantes, corantes, cereais não maltados e carboidratos adicionados ao mosto. Além de classificar as amostras em alta ou baixa fermentação (negri, 2010). Línguas e narinas eletrônicas também foram aplicadas para discriminar e classificar satisfatoriamente cervejas com e sem álcool e provar que os sinais eletroquímicos fornecidos pela matriz estão relacionados às propriedades da cerveja, como amargor e grau alcoólico. Assim, as línguas eletrônicas voltamétricas se mostram como uma ferramenta analítica promissora para o uso em cervejarias (ANDRÉS-IGLESIAS et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Esse trabalho teve como objetivo geral obter a molécula 2-acetil-3,5,6-trihidroxi-4,6-dimetilciclohex-2,4-dienona (Figura 14), que apresenta características estruturais e químicas semelhantes aos α -ácidos. Em seguida, desenvolver uma análise na técnica eletroanalítica para determinação do amargor em cerveja, utilizando a molécula sintetizada como padrão analítico.

Figura 14: Molécula análoga ao α -ácido.



2-acetil-3,5,6-trihidroxi-4,6-dimetilciclohexa-2,4-dienona

Fonte: a autora.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar a molécula 2-acetil-3,5,6-trihidroxi-4,6-dimetilciclohex-2,4-dienona;
- Caracterizar a molécula sintetizada através de técnicas como: RMN de ^{13}C e ^1H , espectrometria de massas e infravermelho;
- Utilizar a molécula 2-acetil-3,5,6-trihidroxi-4,6-dimetilciclohex-2,4-dienona como padrão analítico na determinação do amargor em cerveja através de métodos espectrofotométricos e eletroanalíticos.
- Comprovar a presença dos α -ácidos nas cervejas através de espectrometria de massas, comparando com o teor de amargor encontrado.

3. JUSTIFICATIVA

O uso do lúpulo na cerveja é bastante disseminado, sendo que uma pequena quantidade de lúpulo tem um impacto substancial nas características da bebida. O lúpulo contribui para o aroma e o sabor amargo da cerveja, que equilibram a doçura dos açúcares residuais da cevada maltada. Além disso, ele também estabiliza a espuma da cerveja, melhorando a estabilidade coloidal e ajudando a preservar o mosto (CATTOOR et al., 2013).

Determinar o índice de amargor da cerveja e do lúpulo é de interesse primordial para a indústria cervejeira, uma vez que ambos têm seu valor comercial muitas vezes atrelado a tal amargor (OLIVEIRA NETO 2017). Várias técnicas analíticas espectrofotometricas, acopladas ou não à separação cromatográfica, como UV, HPLC-UV, eletroforese capilar e seus diferentes modos, tais como eletroforese de zona capilar, cromatografia eletrocinética micelar e microemulsão eletrocinética são usadas para quantificar os principais metabólitos do lúpulo, em especial os α -ácidos utilizados na fabricação da cerveja (MASEK et al., 2014) .

Entretanto, a espectrometria no UV não é sensível nem suficientemente seletiva, e não utilizam um padrão analítico (ausência de calibração analítica), visto que quando disponível, os padrões de α -ácidos tem um valor elevado para muitas cervejarias, inclusive as de grande porte. Já os métodos de separação em HPLC e eletroforese requerem a dependência total desses equipamentos, além de terem um custo alto, especialmente para microcervejarias (SEBRAE, 2018).

A garantia de qualidade da cerveja em todas as etapas de sua fabricação requer, entre outras coisas, o conhecimento das características da matéria-prima (insumos) que são vitais à qualidade e especificação do produto. Na cerveja, os parâmetros comumente avaliados são cor, turbidez, sabor, amargor, aroma e espuma (KEUEKELEIRE, 2000)

Trabalhos recentes mostram a importância de também se avaliar a deterioração e aditivos adicionados à cerveja como forma de melhorar o padrão de qualidade do produto (RICO-YUSTE et al. 2016).

Empresas renomadas do setor de análises químicas fabricam equipamentos específicos para quantificação de humulonas, além de polifenóis e outros componentes

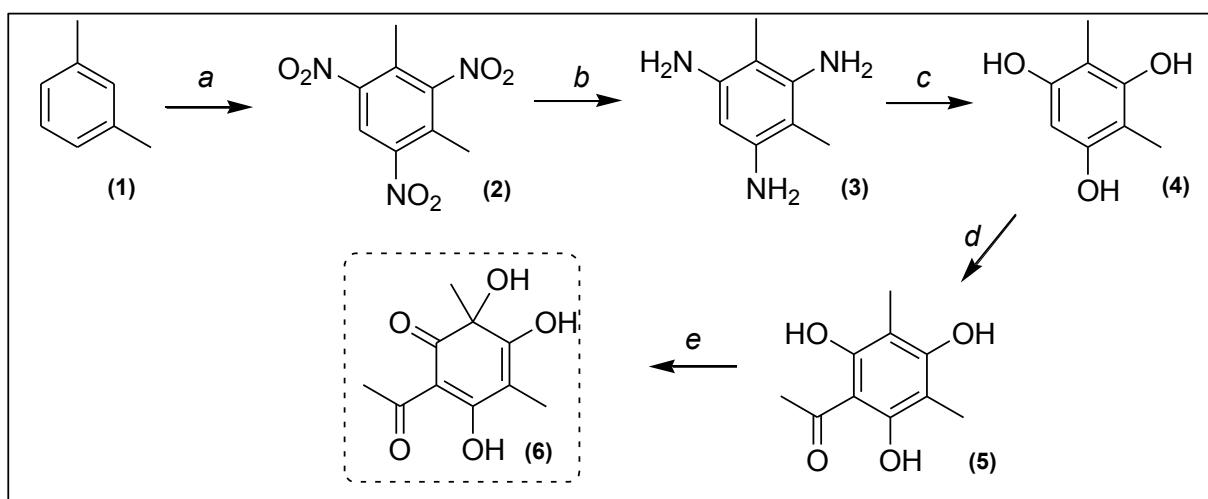
do lúpulo (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2017). No entanto, as técnicas utilizadas possuem alto custo e novamente não atendem as microcervejarias (SEBRAE, 2018).

O método padrão para se estimar o amargor em lúpulo ou cerveja utiliza a medida dos iso- α -ácidos totais por técnicas espectrofotométricas, após sua extração por solventes, expressando sua concentração em *Bitterness Units* (IBU). Essa unidade significa mg de iso- α -ácidos por litro (JASKULA 2008). Porém essa técnica não tem um padrão para uma devida curva de calibração, isso porque esse padrão que antes era vendido, teve sua comercialização descontinuada (SIGMA-ALDRICH). No entanto, sabendo que as humulonas são eletroativas porque possuem sítios passíveis de oxidação (ALMEIDA, 2011). Dessa forma, métodos eletroquímicos de análise podem ser desenvolvidos para a quantificação de tais compostos, no lúpulo ou na cerveja, oferecendo vantagens como rapidez, sensibilidade, confiabilidade, boa frequência analítica e baixo custo (TERASHIMA, 2015).

4. PLANEJAMENTO DE SÍNTESE

A rota sintética foi proposta de acordo com Shi et al. (2010). Partindo-se da molécula m-xileno (1), após nitração (com mistura ácida) e redução (com HCl e Sn metálico) obteria-se a molécula 3. Posterior hidrólise da molécula 3 seguido de acetilação com ácido clorídrico, cloreto de zinco e acetonitrila levaria a cetona 5. O composto almejado 6 poderia ser obtido pela oxidação da molécula 5 na presença de acetato de chumbo. Após cada síntese deveria ser feito a caracterização de cada molécula a fim de verificar se houve a reação pretendida. A etapa até obtenção da molécula 5 baseou-se em Shi et al. (2010), para a obtenção da molécula 6 a literatura baseada foi Campbell e Coppinger (1951).

Figura 15: Rota sintética para obter a molécula similar ao α -ácido.



Nota: a = $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$; b = HCl e $\text{Sn}_{(s)}$; c = H_2O , refluxo; d = HCl (gasoso) $\text{ZnCl}_2/\text{CH}_3\text{CN}$; e = PbAc_2 /metanol;

Fonte: autora.

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 REAGENTES

Solventes utilizados: água destilada; hexano (Neon, CAS Nº: 1120-54-3, PM: 86.18, GRAU: P.A); acetato de etila (ApliChem Panreac ITW Companies, CAS Nº: 141-78-6, GRAU: P.A); e metanol (SIGMA-ALDRIC, CAS Nº: 67-56-1, GRAU: HPLC e P.A). Alguns solventes como hexano, acetato de etila foram previamente tratados no laboratório de destilação do IQ-UFU, no bloco 3J do campus Santa Mônica. Outros como acetonitrila foram deixados na peneira molecular a fim de retirar toda umidade.

Para identificação do pH das solução foi usado papel indicador de pH universal (Macherey-nagel); estanho granulado P.A. (20 mesh) (êxodo científica); acetato de chumbo (Pró-Química CAS nº 301-04-2); meta-xileno (SIGMA-Aldrich, CAS Nº 296325) ácido sulfúrico (Vetec CAS: 7664-93-9), ácido nítrico (Vetec P. A. CAS: 7697-37-2), ácido clorídrico (alphatec P. A. CAS: 7647-01-0), acetonitrila (CAS:75-05-8), cloreto de zinco (CAS:7646-85-7), sulfato de sódio anidro, lúpulo harlletau magnum em pellet T-90 safra 2017 10-12% α-ácido e perclorato de tributilamônio (CAS: 192370-2).

5.2 EQUIPAMENTOS

Foi usado um rotoevaporador da marca IKA, modelo RV 10 basic para o operador rotacional e HB 10 basic para o banho termostático. Chapa de aquecimento marca: Fisatom Modelo: 75A. Balança analítica marca: Shimadzu ATX 224 (0,0010 a 200g).

5.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Para monitorar as reações durante o processo de síntese foi utilizada a cromatografia em camada delgada através de placas de sílica 60-G impregnadas em alumínio (Marca: Macherey-nagel) com detector de UV.

5.4 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS (CG-EM)

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas da marca Shimadzu, modelo QP2010, com potencial ionizante de 70 eV. As condições utilizadas foram: hélio como gás de arraste com fluxo constante de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; coluna capilar de sílica fundida com 5% fenil 95% dimetilpolisiloxano como a fase estacionária (marca Sigma-Aldrich, modelo SPB-5, especificações: $30,0 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$); temperatura do injetor de $220 \text{ }^{\circ}\text{C}$, “split” de 1:20; temperatura do forno inicialmente mantida a $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e depois aumentada a uma velocidade de $6 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ a $280 \text{ }^{\circ}\text{C}$, mantida durante 24 min; tempo de execução 15 min. O intervalo de m/z escaneado foi de 40-650.

5.5 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

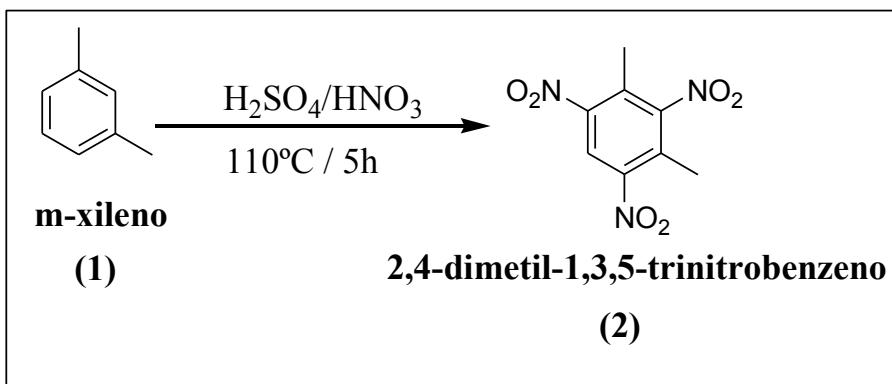
As análises de Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas no equipamento da Bruker, AscendTM 400 Avance III HD (9,4 Tesla), operando a 400 e 100 MHz, para os núcleos de ^1H e ^{13}C , respectivamente. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado e dimetilsulfóxido delterado contendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno ($\delta_{\text{TMS}} = 0,0$).

5.6 SÍNTESE

Para preparar a molécula 2-acetyl-3,5,6-trihidroxi-4,6-dimetilciclohex-2,4-dienona, que é similar ao iso- α -ácido, foi proposta a rota sintética apresentada na Figura 15. A seguir, os procedimentos das etapas da síntese serão apresentados.

5.6.1 Preparo do composto 2,4-dimetil-1,3,5-trinitrobenzeno (2)

Figura 16: Reação de obtenção do 2,4-dimetil-1,3,5-trinitrobenzeno (2).

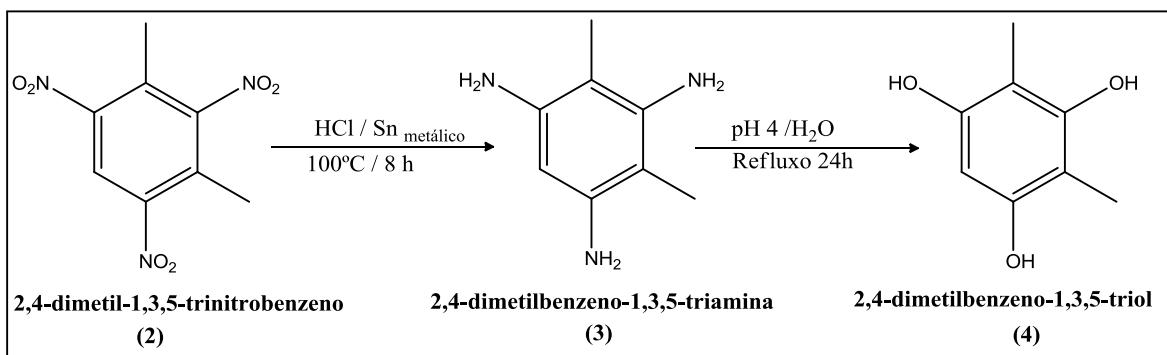


Fonte: a autora.

Utilizou-se o procedimento de Shi et al. (2010). Em um balão de duas bocas foi adicionado 1,75 g (0,0165 mol) de *m*-xileno. Sob banho de gelo, adicionou-se lentamente (cerca de 30 min) uma mistura com 15 mL de ácido sulfúrico e 15 mL de ácido nítrico. Na sequencia, aqueceu-se a mistura reacional a 110°C por 5 h, sob agitação. Ao final (que foi monitorada por CCD) o produto foi resfriado, sob banho de gelo, filtrou-se sob vácuo, utilizando um funil com placa porosa sinterizada, lavando o produto da reação de água destilada (5x 250 mL). Em seguida, uma solução de bicarbonato de sódio 10% (m/v) foi adicionada ao sólido que estava sendo filtrado, e mais uma vez lavou-se água destilada (200 mL). O sólido foi colocado em um erlenmeyer e dissolvido com o acetato de etila e seco com sulfato de sódio anidro. O secante foi removido por filtração simples, rotoevaporou-se o solvente (cerca de 40°C) obtendo-se um sólido branco identificado como sendo o composto 2.

5.6.2 Preparo do composto 2,4-dimetilbenzeno-1,3,5-triol (4)

Figura 17: Reação de obtenção do 2,4-dimetilbenzeno-1,3,5-triol (4).



Fonte: a autora.

A primeira vez que foi feito tal procedimento não se obteve a molécula desejada, provavelmente devido ao estanho utilizado. Após evidenciar esse fato foi comprado outro material, quando enfim obteve-se conforme descrito abaixo.

Utilizou-se o procedimento de Shi et al. (2010). Em um balão de duas bocas acoplado a um condensador de refluxo contendo 3,05 g (0,0126 mol) do composto 2 adicionou-se uma mistura contendo 4,90 g (0,04 mols) de estanho metálico e 22 mL de ácido clorídrico. Deixou a reação sob agitação durante 8 h à 100 °C. Ao final, à temperatura ambiente, adicionou-se solução de hidróxido de sódio 10% (m/v), sob agitação, até atingir pH 4,0. Atingido o pH, levou novamente para aquecimento na mesma temperatura da primeira reação, sob acoplamento do condensador, deixando-a se processar por 24 horas. Decorrido esse tempo, o produto da reação foi extraído com acetato de etila (4 x 50 mL), seco com sulfato de sódio anidro, em seguida rotaevaporou o solvente. Obteve-se um sólido de cor amarela. Uma massa de 1,27 g do sólido obtido foi purificado em coluna cromatográfica (Figura 18) utilizando-se sílica gel (gramatura 60), e o eluente da coluna foi acetato de etila e hexano (3:2), sendo obtido o composto 4.

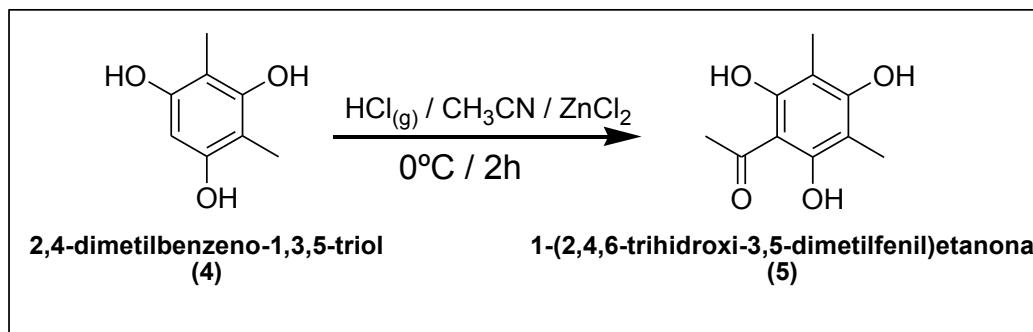
Figura 18: Imagem da aparelhagem utilizada no preparo do composto 4 por refluxo e da purificação por coluna cromatográfica.



Fonte: autora.

5.6.3 Preparo do composto 1-(2,4,6 trihidroxi-3,5-dimetilfenil)etanona (5)

Figura 19: Reação de obtenção do 1-(2,4,6 trihidroxi-3,5-dimetilfenil)etanona (5).

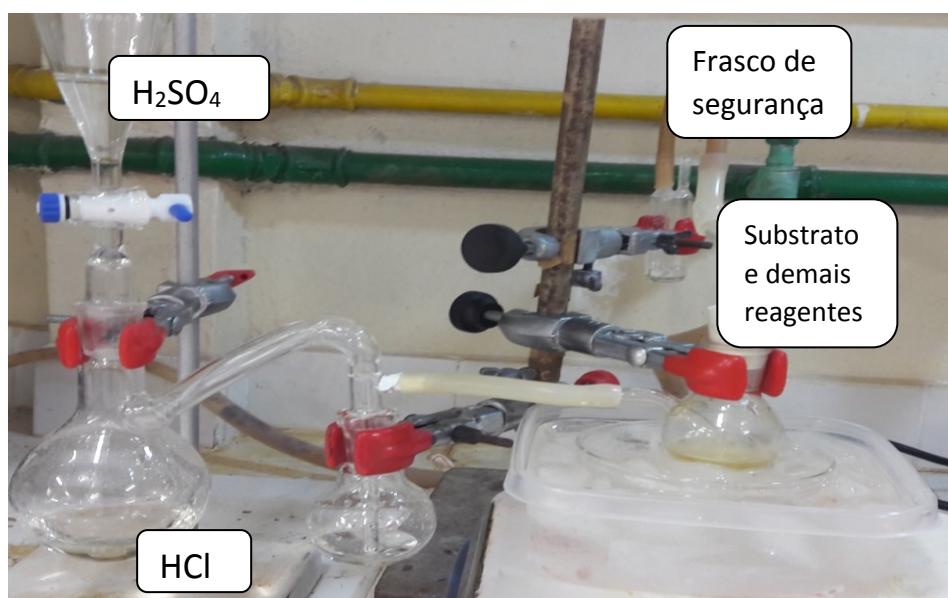


Fonte: autora.

Utilizou-se o procedimento conforme Pinheiro et al. (2006). Uma mistura contendo 0,85g (0,0052 mols) do composto 4 (previamente deixado em dessecador para retirada de toda umidade) foi solubilizado em 5 mL de acetonitrila (deixada por 4 horas na peneira molecular a fim de retirar toda umidade) e 2,0g de cloreto de zinco (0,01 mols) foram colocados em um balão com saída lateral acoplada a um sistema para borbulhamento de HCl gasoso. O procedimento adotado na geração de HCl foi:

com um funil de separação contendo ácido sulfúrico, que foi vagarosamente gotejado em ácido clorídrico, assim o HCl gasoso foi aos poucos reagindo com o composto 4, a baixa temperatura (0°C) por 2 horas. Ao final da reação o balão foi colocado no congelador, e decorrido 24 horas retirado e novamente posto a reagir com HCl gasoso, novamente colocado no congelador e depois de 3 dias esse foi retirado. Em seguida adicionou-se 30mL de água deionizada e acoplou um condensador e manta de aquecimento deixando por 30 minutos sob refluxo. Desligou o aquecimento, resfriou a temperatura ambiente e o produto foi extraído com acetato de etila (3 X 30mL). Rotoevaporou o solvente, obtendo-se um sólido amarelo claro.

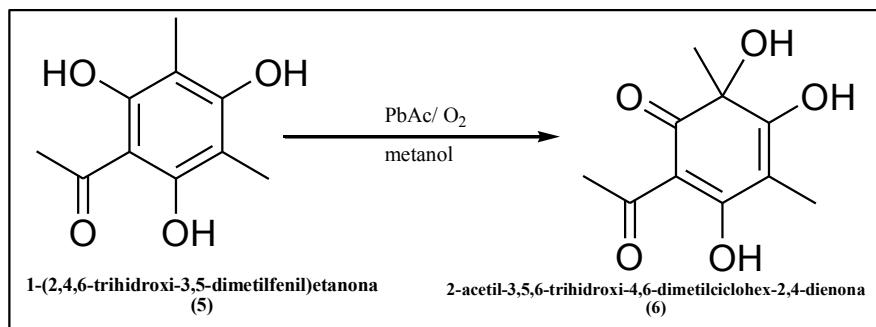
Figura 20: Imagem da aparelhagem utilizada no preparo do composto 5.



Fonte: autora.

5.6.4 Preparo do composto 2-acetil-3,5,6-trihidroxi-4,6-dimetilciclohex-2,4-dienona (6)

Figura 21: Síntese da 2-acetil-3,5,6-trihidroxi-4,6-dimetilciclohex-2,4-dienona (6).



Fonte: autora

Esse procedimento foi feito conforme Brown e Howard (1960), com adaptações. Inicialmente foram pesados 0,500g do composto 5. Esse foi colocado em um balão de duas bocas e acrescentado 10 mL de metanol. Em seguida foi adicionado 1,0g de acetato de chumbo, dissolvido em metanol (2 mL), e acoplada uma bexiga cheia de gás oxigênio, a qual tinha uma seringa que borbulhava esse gás na amostra (Figura 22). A reação ocorreu por 1 hora e 30 minutos, decorrido esse tempo verificou (por placa de CCD) que não restava mais material de partida, e um sólido havia se formado. Em seguida o sólido foi filtrado e adicionou-se no funil contendo 20 mL de ácido sulfúrico (6 mol L⁻¹). Na sequência o sólido foi filtrado com éter etílico e seco em dessecador por 4 horas.

Figura 22: Imagem da aparelhagem utilizada no preparo do composto 6.



Fonte: autora

5.7 IDENTIFICAÇÃO DOS α -ÁCIDOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS NAS AMOSTRAS DE CERVEJA E EXTRATO DE LÚPULO

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência hifeno ao espectrômetro de massas (CLAE/EM: marca Agilent modelo Infinity 1260) de alta resolução do tipo Q-TOF da marca Agilent® modelo 6520 B com fonte de ionização por electrospray (IES) foram realizadas no Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IBTEC-UFU), em um CLAE (Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Poroshell, 3 mm de diâmetro interno, 10 cm de comprimento, partículas de 2,7 μm , a fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1% v⁻¹) (A) e metanol (B), com o gradiente: 70% de B (0 min), 98% de B (0-10 min); 100% de B (10-17 min)). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8L/min a uma temperatura de 220 °C e, no capilar, foi aplicado uma energia de 4,5KV.

Três tipos de cerveja com diferentes IBU foram selecionadas para análises por espectrometria de massas. A Tabela 1 e a Figura 23 mostram as cervejas analisadas e suas respectivas especificações.

Tabela 1: Identificação das cervejas com diferentes graus de IBUs.

Cerveja	Nome comercial	Estilo	Marca	IBU	ABV
1	Puro malte Pilsen	Pilsen	Bruder®	15	4,5%
2	Damiana	IPA	Invicta®	50	5,5%
3	Fênix	Imperial IPA	2 cabeças®	100	8,1%

Fonte: autora.

Figura 23: Cervejas com diferentes graus de IBU.



Fonte: autora.

Três tipos de cerveja com diferentes IBU foram selecionadas para análises por espectrometria de massas. A cerveja 1 é de baixa fermentação, portanto família das Lagers, estilo Premium American Lager, 4,5% de teor alcoólico e pouco lupulada com 15 de IBU, podendo ser considerada uma cerveja leve e de baixo amargor. A cerveja 2 é de alta fermentação, família das Ales, do estilo IPA (India Pale Ale) e com uma lupulagem maior, se comparada a Pilsen, obtendo 50 de IBU, sendo classificada com um amargor médio alto e mais intensa, equilibrando com 5,5% de teor alcoólico. A cerveja 03, é do tipo de fermentação e da mesma família da cerveja 2, porém com uma lupulagem extrema, obtendo, dessa forma, 100 de IBU, e seus 8,1% de teor alcoólico faz com seja uma cerveja extremamente intensa.

Para a análise por espectrometria de massas dessas cervejas foi colocado um volume de 10 mL em um bêquer e agitado vigorosamente com bastão de vidro e depois por 2 minutos no ultrassom até que todo CO₂ fosse removido. Em um vial foi adicionado 1 mL da amostra e 1 mL de metanol, agitou-se, filtrou-se (PTFE, 0,22 µm) e injetou-se no equipamento.

O extrato de lúpulo foi preparado de acordo com CATTOOR (2013), com algumas adaptações: uma massa de 2,46 g de pellet de lúpulo marca Hallertau Magnum macerado com almofariz e pistilo e extraído com isooctano (3 X 50 mL). Posteriormente foi deixado no congelador por 4 horas, assim que retirado do congelador, centrifugado, sendo a parte sólida descartada. O sobrenadante foi colocado em rotovap para retirada do solvente e o resíduo gerado ficou no dessecador por duas horas. Foi obtido 0,43 g do extrato de α-ácido.

Figura 24: Esquema para obtenção do extrato de lúpulo.



Fonte: autora.

Os parâmetros cromatográficos foram: 0,2 mL min⁻¹ de fluxo constante da fase móvel com a composição de 30 % metanol e 70 % de água acidificada com ácido fórmico (0,1 % (v.v⁻¹), o volume de injeção das amostras foi de 2 µL. Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 20 psi, gás secante a 8 L.min⁻¹ a uma temperatura de 220 °C e no capilar foi aplicado uma energia de 4,5 KV.

Os espetros de massa adquiridos por infusão direta foram extraídos para o formato TXT, e submetido no programa MATLAB (MATrix LABoratory), no qual foram realizados as análises de PCA (Análise de Componentes Principais) e HCA (Análise de Cluster Hierárquica).

5.8 INSTRUMENTAÇÃO ELETROQUÍMICA

As medidas voltamétricas e amperométricas foram realizadas utilizando um potenciómetro/galvanômetro µAUTOLAB 128N (Eco Chemie, Utrecht, The Netherlands - Metrohm;) interfaceado e controlado por um computador através do software NOVA 1.11.

5.8.1 *Eletrodos de trabalho e pré-tratamento*

Neste trabalho foi utilizado eletrodo de diamante dopado com boro (BDD) com área geométrica de 0,18 cm² como eletrodo de trabalho. O BDD foi adquirido da empresa Adamant Technologies SA, La Chaux-de-Fonds, Suíça (atualmente chamada NeoCoat SA - La Chauxde-Fonds,Suíça). Trata-se de uma placa a base de silício (0,7 x 0,7 cm) com espessura de aproximadamente 1,2 mm coberta com fino filme de diamante (1,2 µm) com nível de dopagem de boro de 7000 a 8000 ppm. Diariamente, antes do início da realização das medidas eletroquímicas, o eletrodo de BDD foi submetido a um processo de limpeza e/ou ativação eletroquímica. Estes procedimentos de limpeza podem ser realizados de duas formas:

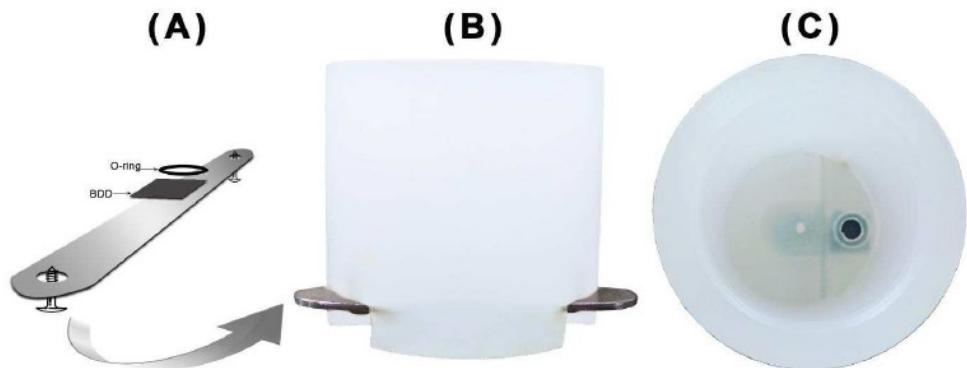
- Ativação anódica – Aplicação de corrente de +0,01 A em meio de solução de tampão Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹ (pH = 2,0);
- Ativação catódica – Aplicação de corrente de -0,01 A em meio de solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹.

Estes procedimentos são similares aos encontrados na literatura (TERASHIMA et al., 2003) e tinham duração de aproximadamente 16 minutos quando apenas a ativação catódica era realizada e 30 minutos quando ambas as ativações eram realizadas. Em todos os experimentos utilizou-se um eletrodo de referência de Ag/AgCl(KCl sat), preparado no próprio laboratório por meio da deposição de AgCl sobre um fio de Ag através da aplicação do potencial de +0,3 V em meio a uma solução de HCl 0,10 mol L⁻¹ durante 1,0 hora (BRETT; BRETT 1993). Um fio de platina foi utilizado como eletrodo auxiliar.

5.8.2 Células eletroquímicas

Uma célula eletroquímica de polipropileno com diâmetro externo de 5 cm, diâmetro interno de 3,5 cm, altura de 4,5 cm e com volume total de 25 mL foi utilizada nas medidas voltamétricas estacionárias: voltametria cíclica e voltametria de onda quadrada (SWW). Na parte inferior da célula, o eletrodo de trabalho de BDD (0,7 cm x 0,7 cm) foi posicionado através de pressionamento entre um anel de borracha (O-ring, 0,18 cm²) e uma placa metálica que serve para contato com o potenciómetro Figura 25. Na parte superior os eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente Ag/AgCl e Pt.

Figura 25: Célula eletroquímica de polipropileno, visão A, B e C.



Nota: A: Esquema de fixação e contato elétrico do eletrodo BDD na célula eletroquímica convencional; B: vista central da célula eletroquímica (modo convencional e estacionário) e C: vista superior da célula com o eletrodo de BDD posicionado no fundo da mesma (área geométrica definida pelo O-ring).

Fonte: SILVA, W. P. 2017

5.8.3 *Eletrólito*

O eletrólito usado foi o perclorato de tributilamônio (TBAP), na concentração de $0,2\text{ mol}^{-1}$.

5.8.4 *Preparo das amostras para análise eletroquímicas*

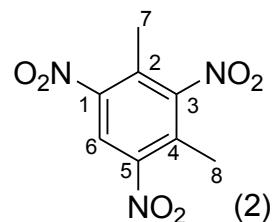
Para a análise eletroquímica dessas cervejas foi colocado um volume de 10 mL em um béquer e agitado vigorosamente com bastão de vidro e depois por 2 minutos no ultrassom até que todo CO₂ fosse removido. Em seguida foi feita uma extração com isooctano (3 x 50mL), rotovaporado o solvente, e o extrato seco em dessecador, redissolvido em acetonitrila. O extrato de lúpulo foi preparado conforme item 5.7, e depois o extrato seco foi redissolvido um acetonitrila.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 TENTATIVA DE SÍNTESE DO COMPOSTO ANÁLOGO AO α -ÁCIDO

6.1.1 1,3-Dimetil-2,4,5-trinitrobenzeno (2)

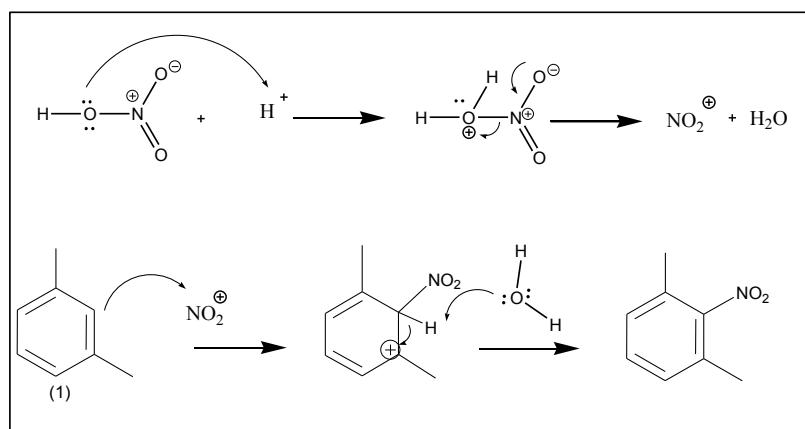
Figura 26: 1,3-Dimetil-2,4,5-trinitrobenzeno (2).



Fonte: autora.

Através da reação de nitração do composto 1 obteve uma massa final de 3,09 g (0,0128 mol) de 1,3-dimetil-2,4,5-trinitrobenzeno. O rendimento foi calculado e resultou em 77,6%. Essa reação é de substituição eletrofílica aromática (MCMURRY, 2005), sendo o mecanismo da reação representado na Figura 27. O íon nitrônio (NO^{2+}) é o eletrófilo nessa reação. O anel aromático possui dois grupos metilas (grupo ativante), portanto a reação continuada resulta na substituição de 3 hidrogênios do anel aromático por 3 grupos nitros, formando um composto tri-substituído. O grupo metila é um grupo doador de elétrons, portanto um grupo ativante, por isso o nitro entra no anel aromático na posição *ortho* ao grupo metila.

Figura 27: Mecanismo de nitração do *m*-xileno (1).



Fonte: autora.

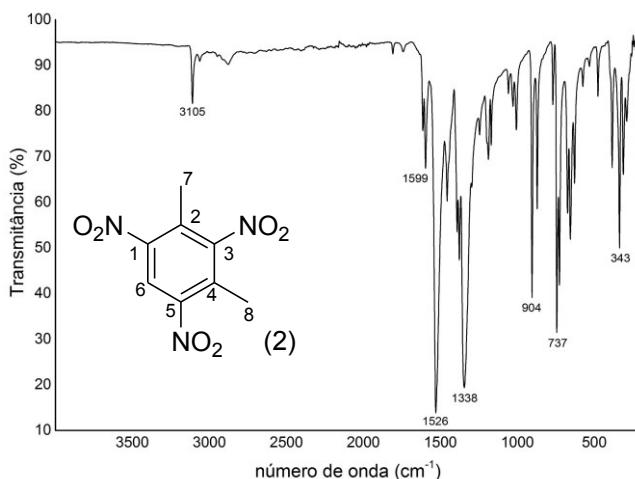
Para a formação do composto indicado, ocorreram mais duas adições de forma análoga à primeira.

Em seguida o produto foi caracterizado usando as seguintes técnicas:

- Infravermelho

Na Figura 28 está mostrado o espectro de infravermelho do composto 2. Os nitrocompostos apresentam duas bandas fortes de estiramento uma entre 1355 a 1315 cm⁻¹ e outra de 1550 a 1490 cm⁻¹ (PAVIA et al., 2010). Observando o espectro do composto 2, verificam-se duas bandas referentes aos estiramentos assimétricos e simétricos do grupo nitro em 1526 e 1338 cm⁻¹. Além disso, observam-se no espectro as bandas correspondentes às deformações angulares de C-H aromático em 904 e 737 cm⁻¹ e a banda em 3105 cm⁻¹, que pode ser atribuída ao estiramento aromático quanto de estiramento de C_{sp}³-H. A banda em 1599 cm⁻¹ pode ser atribuída ao estiramento de C=C aromático.

Figura 28: Espectro de infravermelho do composto 2.



Fonte: autora.

- Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas

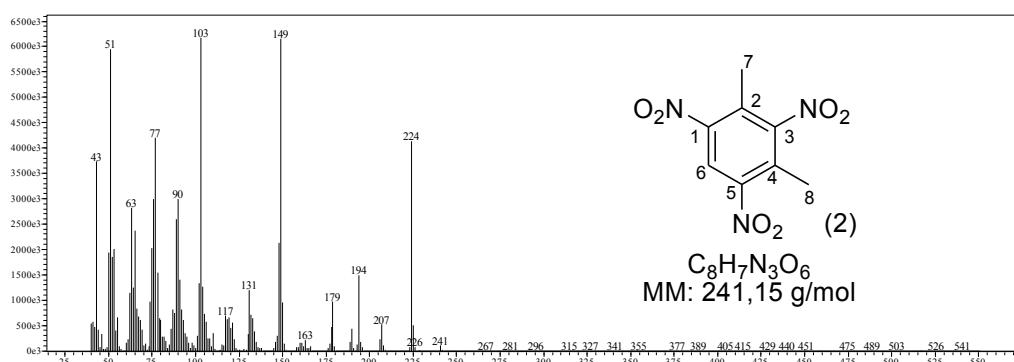
O espectro de massas do composto 2 (mostrado na Figura 29) apresenta picos referentes às propostas de fragmentações descritas na Figura 30:

- m/z 224 [M-17] referente à perda de um ânion OH⁻ pelo íon molecular m/z 241;
- m/z 194 [M-30] referente à perda de um radical NO[•] pelo fragmento m/z 224;
- m/z 195 [M-46] referente à perda de um radical NO₂[•] pelo íon molecular m/z 241;
- m/z 149 [M-46] referente à perda de um radical NO₂[•] pelo fragmento m/z 195;

- m/z 103 [M-46] referente à perda de um radical $\text{NO}_2\bullet$ pelo fragmento m/z 149;

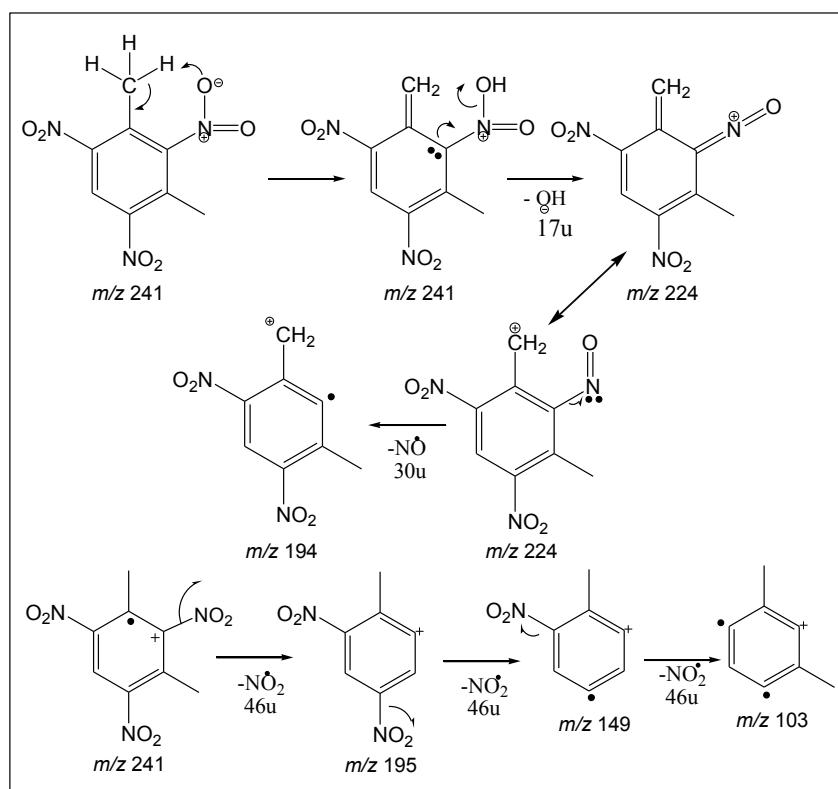
Pelo espectro de massas é possível comprovar que o anel aromático foi trisubstituído, se houvesse somente um grupo nitro ligado ao anel o pico do íon molecular seria m/z 151 e dissustituido seria m/z 196, no entanto se observa um pico em m/z 241 e outros fragmentos anteriores comprovando a substituição de 3 grupos nitro.

Figura 29: Espectro de massas obtido por GC-EM do composto 2.



Fonte: autora.

Figura 30: Proposta de fragmentação do composto 2.

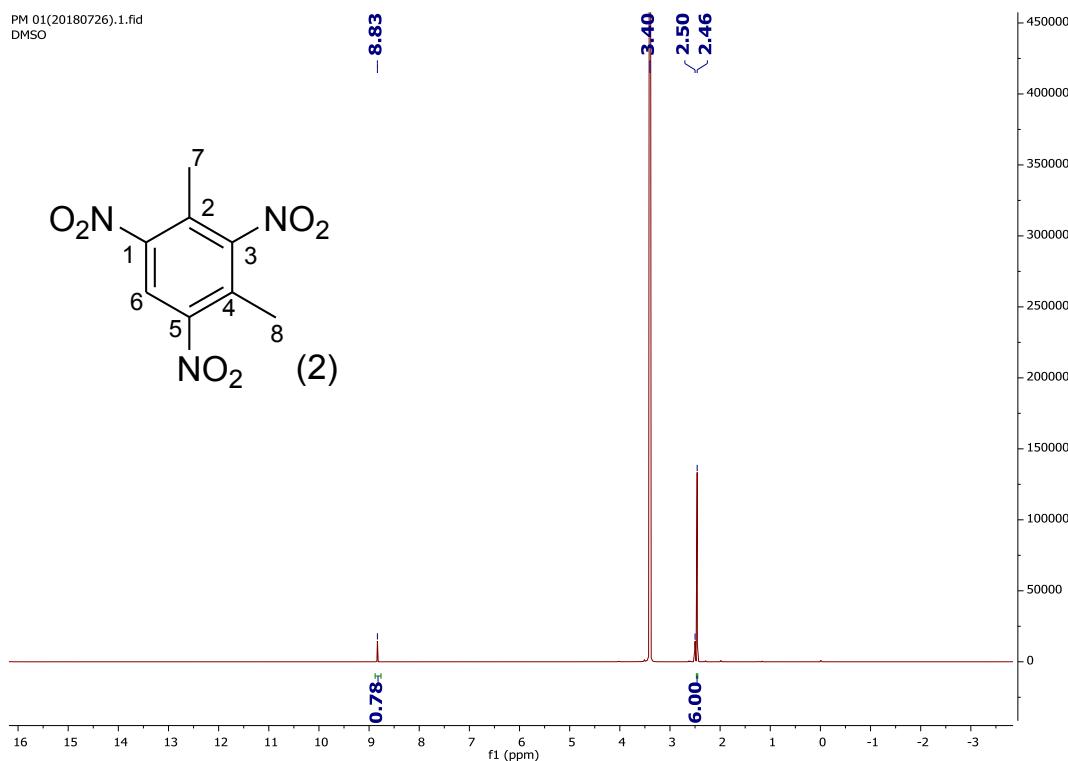


Fonte: autora.

- Ressonância magnética nuclear (RMN)

A Figura 31 mostra o espectro de RMN de ^1H do composto 2. O singuleto com deslocamento de δ : 2,46 ppm refere-se aos 6 hidrogênios dos dois grupos metilas, e o singuleto em δ : 8,83 ppm do hidrogênio ligado ao carbono do anel aromático (o único que não tem substituição). O deslocamento maior em δ : 3,40 ppm é de água, e em δ : 2,5 ppm do solvente DMSO não deuterado.

Figura 31: Espectro de RMN- ^1H (400 MHz, DMSO) do composto 2.

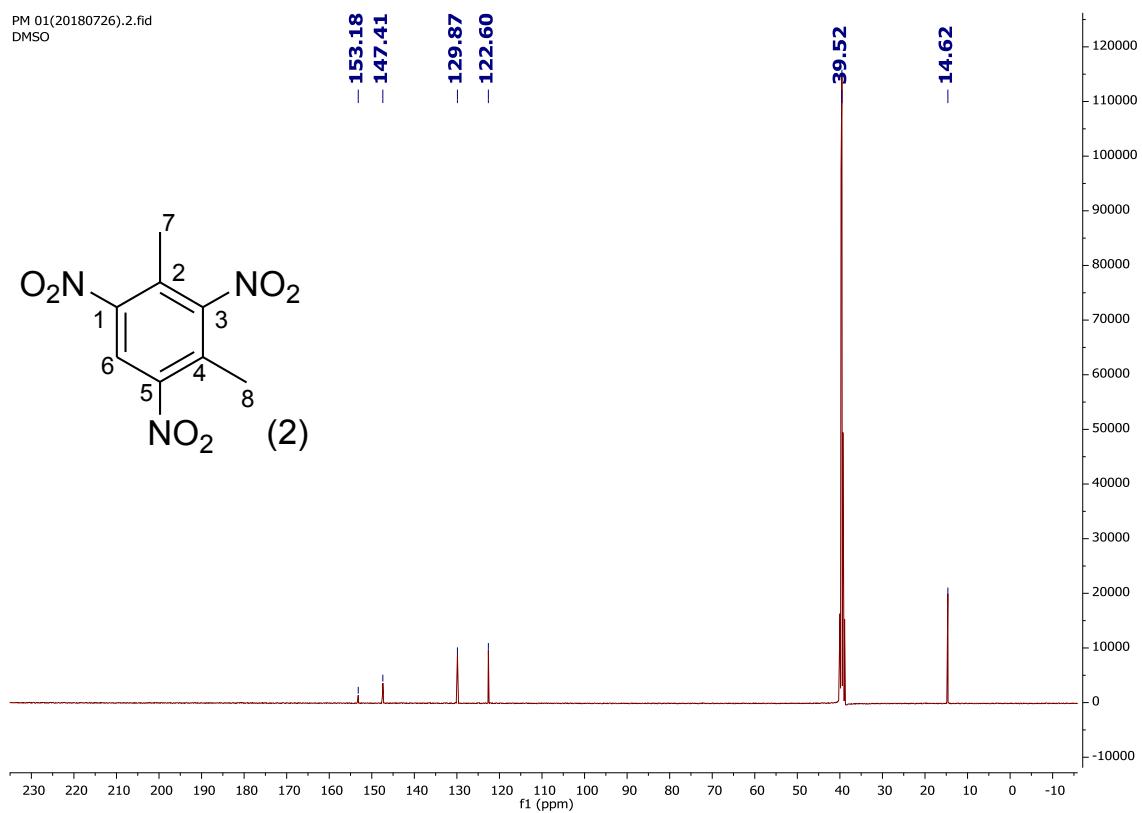


Fonte: autora.

A Figura 32 mostra o espectro de RMN de ^{13}C do composto 2. Observa-se que o deslocamento em δ : 39,52 ppm é referente ao solvente DMSO, em δ : 14,62 ppm é referente aos dois carbonos dos grupos metilas ligados ao anel aromático (C7 e C8), δ : 122,60 ppm é referente aos dois carbonos do anel aromático ligados aos grupos metilas (C2 e C4), δ : 129,87 ppm é referente aos dois carbonos do anel aromático ligados aos grupos nitro (C1 e C5) e δ : 147,41 ppm é referente ao carbono do anel aromático sem ligante (C6), δ : 153,18 ppm é referente ao carbono do anel aromático ligado ao grupo nitro (C3).

O carbono C3 é o mais desblindado porque está ligado ao grupo nitro (retirador de elétrons) e como sua intensidade é menor, sugere-se que ele seja referente a apenas um carbono. O deslocamento de C6 foi sugerido baseado na intensidade (menor que os deslocamentos mais blindados) só que é maior que C3, pois se trata de um carbono hidrogenado. Na sequência, sugere-se que o deslocamento subsequente seja referente aos dois carbonos C1 e C5, pois estão ligados ao grupo nitro portanto desblindados e apresentam maior intensidade. O deslocamento seguinte, atribui-se ao C2 e C4, pois estão ligados a grupo metila (efeito doador de elétrons) e apresentam intensidade comparável ao C1 e C5.

Figura 32: Espectro de RMN-¹³C (100 MHz, DMSO) do composto 2.

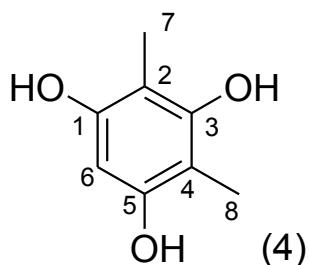


Fonte: autora.

6.1.2 2,4-Dimetilbenzeno-1,3,5-triol (4)

A síntese desse composto não ocorreu nas primeiras tentativas, provavelmente porque o estanho havia oxidado. Após utilizar o estanho metálico de outro fornecedor, verificou-se que a reação ocorreu através da análise espectroscópica do produto obtido.

Figura 33: 2,4-Dimetilbenzeno-1,3,5-triol (4).



Fonte: autora.

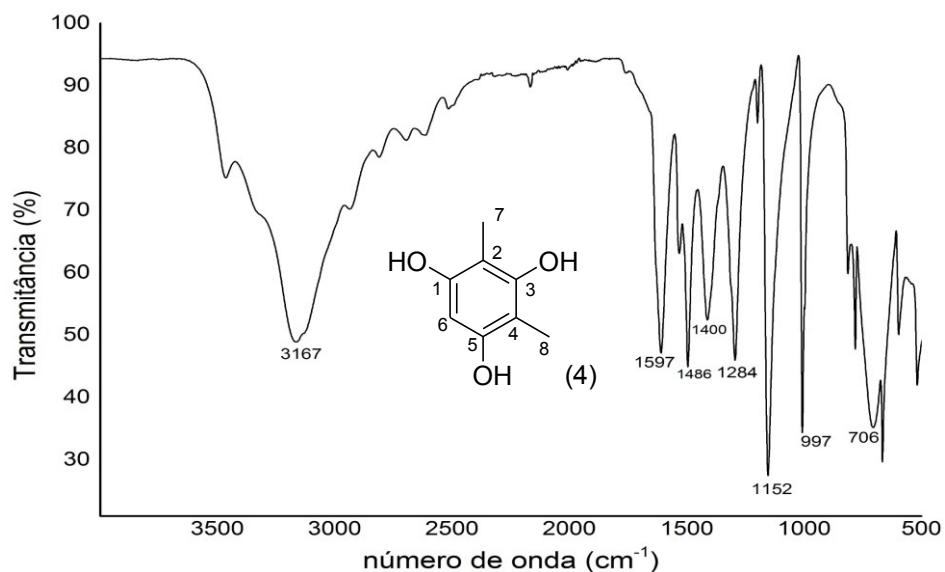
Os grupos nitros do composto 2 foram reduzidos à aminas através de uma reação com estanho metálico em ácido clorídrico à 100°C durante 8 horas. Posteriormente, o pH do meio reacional foi ajustado para pH 4, utilizando um solução de NaOH (10%). Após aquecimento a 100°C por 24 horas em refluxo, foi obtido uma mistura de dois compostos. A mistura foi devidamente separada por cromatografia em coluna (conforme descrito no procedimento) e obteve-se 1,01 g (0,0066 mol) do composto 4, resultando no rendimento de 52,4%.

Em seguida o produto foi caracterizado usando as seguintes técnicas:

- Infravermelho

A Figura 34 mostra o espectro de infravermelho do composto 4. De acordo com a literatura (PAVIA et al., 2010), os fenóis apresentam bandas de estiramento de O-H intensas e largas entre 3400 a 3300 cm⁻¹ envolvendo a formação de ligações de hidrogênio, no espectro observa-se uma banda em 3167 cm⁻¹ característica desse estiramento. Em 1597 e 1486 cm⁻¹ observa-se bandas de estiramento C=C aromático e em 1284 cm⁻¹ uma banda de estiramento de C-O, além de bandas em 997 e 706 cm⁻¹ referentes às deformações angulares de C-H aromático. A banda característica de C_{sp3}-H pode ter sido encoberta pela de O-H.

Figura 34: Espectro de infravermelho do composto 4.



Fonte: autora.

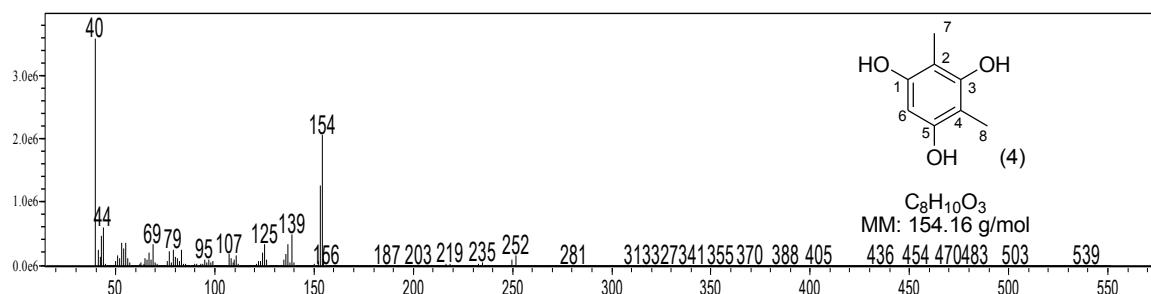
- Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas

O espectro de massas do composto 4, mostrado na Figura 35, apresenta picos referentes às propostas de fragmentações descritas na Figura 36:

- m/z 139 [M-15] referente à perda de um radical metila pelo íon molecular 154;
- m/z 98 [M-56] referente à perda de 56 unidades (C_3H_4O) pelo íon molecular 154.

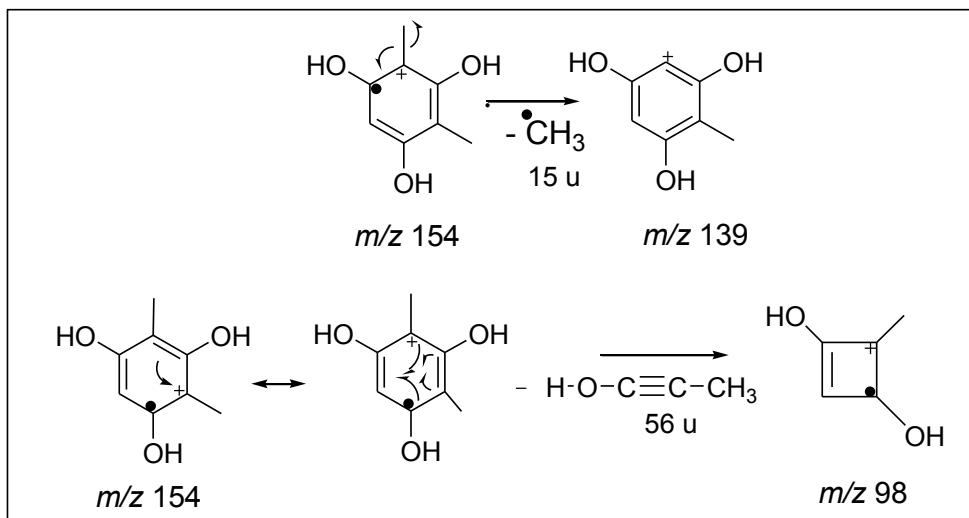
A maior evidência que houve a transformação química foi o espectro de massas com pico do íon molecular em m/z 154. Além disso, o infravermelho é também um indicativo com uma banda bem larga característica de OH.

Figura 35: Espectro de massas obtido por GC-EM do composto 4.



Fonte: autora.

Figura 36: Proposta de fragmentação do composto 4.

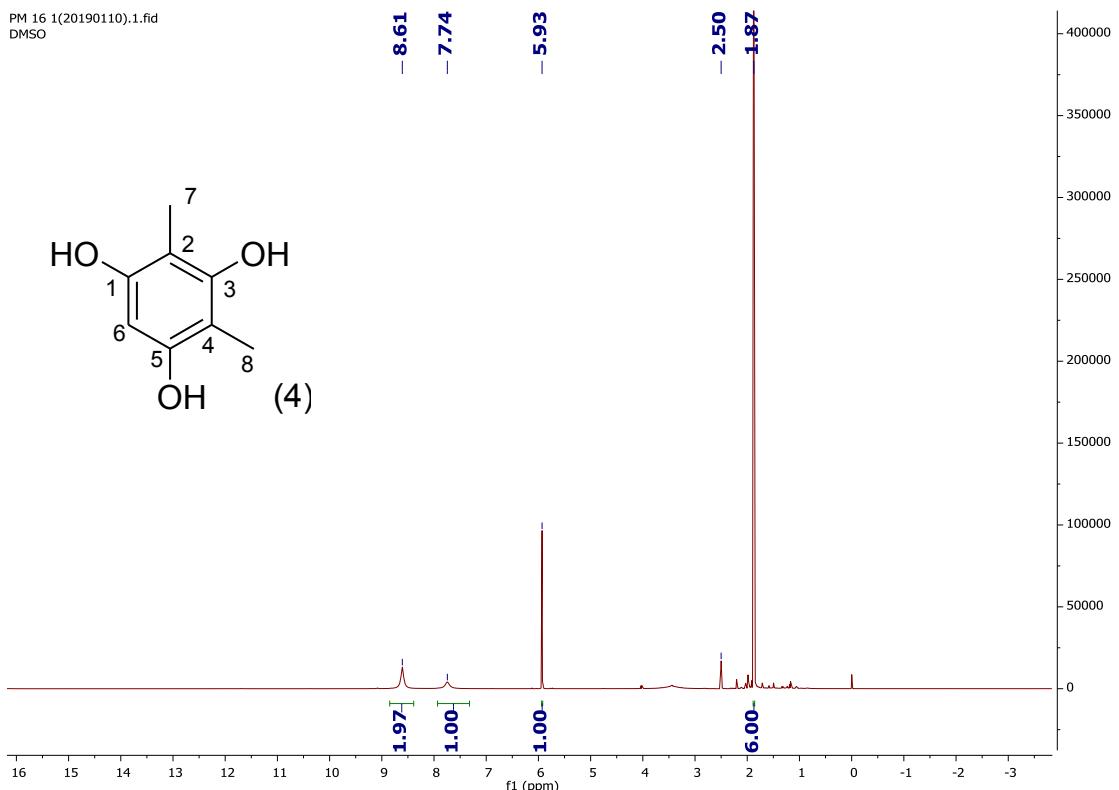


Fonte: autora.

- Ressonância magnética nuclear (RMN)

A Figura 37 mostra o espectro de RMN de ^1H do composto 4. O singuleto com deslocamento de δ : 2,50 ppm trata-se do solvente usado, DMSO. O singuleto em δ : 5,93 ppm refere-se ao hidrogênio do anel aromático (ligado ao carbono 6), e o singuleto em δ : 1,97 ppm refere-se aos 6 hidrogênios do dois grupos metilas. O deslocamento em δ : 8,61 ppm é atribuído as duas hidroxilas com ambiente químico idêntico, ligadas no carbono 1 e 5. E o sinal de δ : 7,74 ppm se refere à outra hidroxila ligada a C3.

Figura 37: Espectro de RMN-¹H (400 MHz, DMSO) do composto 4.

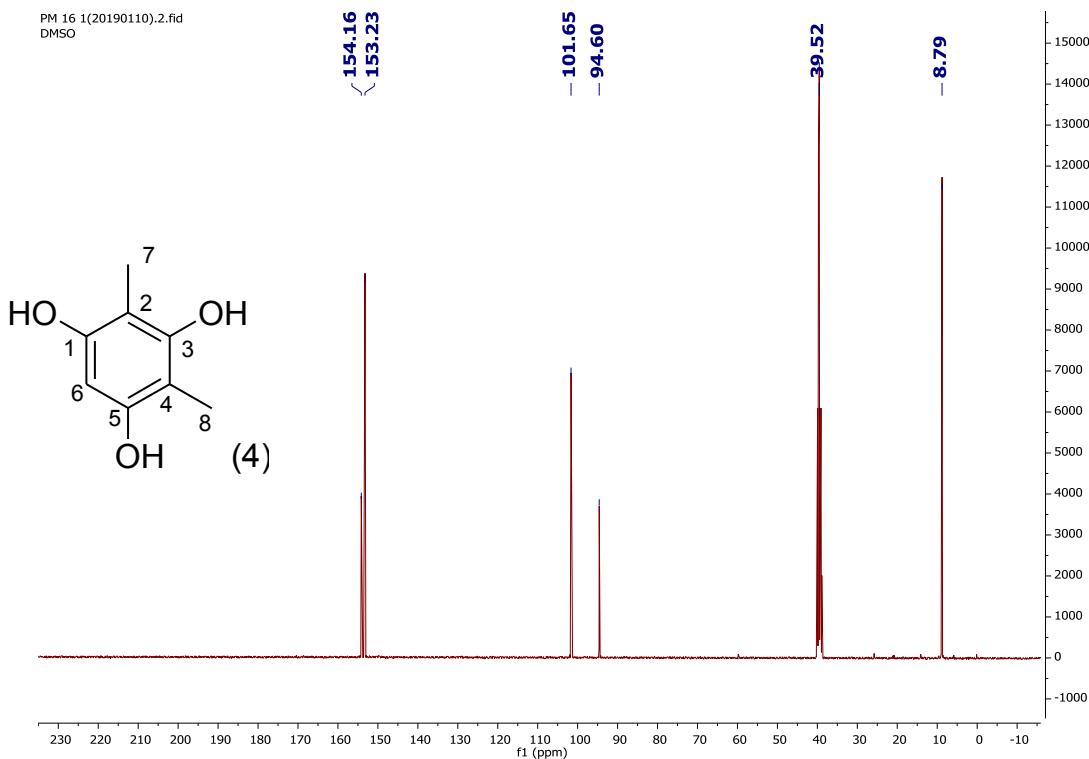


Fonte: autora.

A Figura 38 mostra o espectro de RMN de ¹³C do composto 4. O deslocamento em δ : 39,52 ppm é o sinal do solvente DMSO, δ : 8,79 ppm é referente aos dois carbonos metílicos (C7 e C8), em δ : 94,60 ppm refere-se ao único carbono do anel que não é substituído (C6), em δ : 101,65 ppm refere-se ao carbono aromático ligado aos grupos metílicos (C2 e C4), em δ : 153,23 ppm refere-se aos carbonos aromáticos ligados ao grupo OH (C1 e C5) e em δ : 154,16 ppm refere-se ao carbono ligado do anel aromático ao grupo OH (C3).

O carbono C3 é o mais desblindado porque esta ligado ao grupo OH (retirador de elétrons por efeito induutivo) e como sua intensidade é menor, sugere-se que ele seja referente a apenas um carbono. O deslocamento de C6 foi sugerido baseado na intensidade (menor que os deslocamentos mais blindados) só que é maior que C3, pois se trata de um carbono hidrogenado. Na sequência, sugere-se que o deslocamento subsequente ao de C3 seja referente aos dois carbonos C1 e C5, pois estão ligados ao grupo OH e apresentam maior intensidade. O deslocamento seguinte atribui-se ao C2 e C4, pois estão ligados a grupo metila (efeito doador de elétrons) e apresentam intensidade maior que C1 e C5.

Figura 38: Espectro de RMN-¹³C (100 MHz, DMSO) do composto 4.

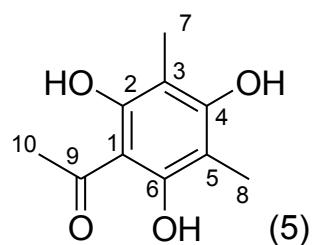


Fonte: autora.

6.1.3 1-(2,4,6-Trihidroxi-3,5-dimetilfenil)etanona (5)

A primeira vez que houve a tentativa dessa síntese ela não ocorreu, provavelmente devido ao fato que o fluxo de HCl gasoso borbulhado no composto não foi o suficiente. Consultando a literatura (PINHEIRO, 2006), verificou-se que deveria ter repetido a reação e manter um intervalo da primeira para segunda reação por 24 horas.

Figura 39: 1-(2,4,6 trihidroxi-3,5-dimetilfenil)etanona (5).



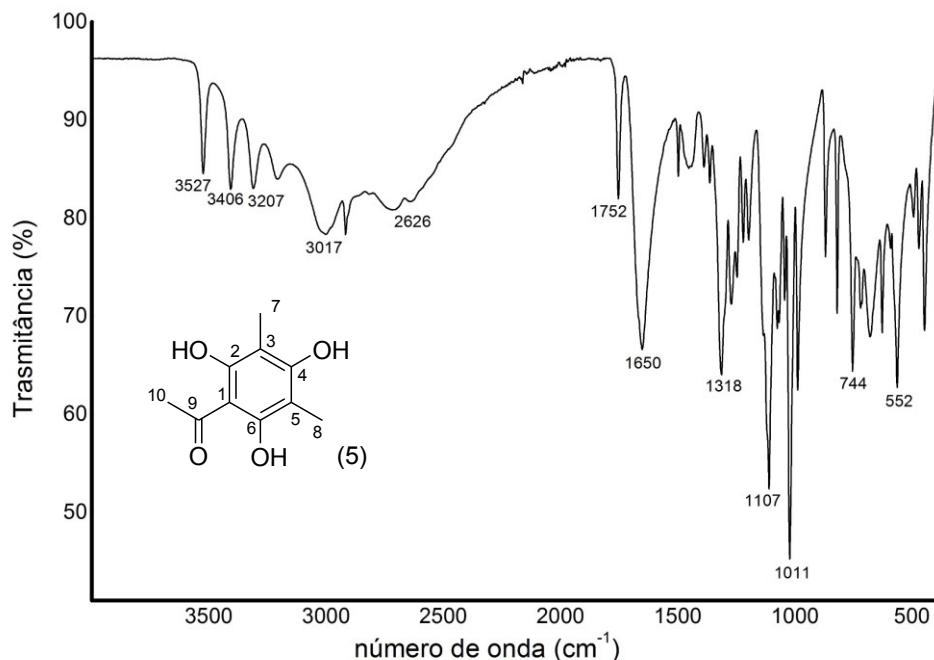
Fonte: a autora.

Após a reação, a massa final foi de 0,410g. O monitoramento por placa de CCD mostrou que o reagente (composto 4) foi consumido, assim o produto obtido foi analisado pelas técnicas espectroscópicas que seguem.

- Infravermelho

De acordo com a literatura (PAVIA et al., 2010), as cetonas apresentam uma banda forte do grupo C=O que aparece na faixa de 1720 a 1708 cm⁻¹ em cetonas alifáticas simples. Porém, quando a carbonila é ligada a um grupo fenil, essa banda move-se para frequências mais baixas. A banda no espectro tem valor de 1650 cm⁻¹, e esse valor é influenciado pelos substituintes no anel aromático e suas respectivas posições (PAVIA et al., 2010). A banda de C=O pode ficar entre 1655 e 1610 cm⁻¹, caso os substituintes sejam hidroxilas e aminas, essa drástica redução se deve, além do efeito doador de elétrons por ressonância dos grupos OH ou NH também a formação de ligações de hidrogênio intramolecular. Assim o valor encontrado no espectro está coerente com o esperado.

Figura 40: Espectro de infravermelho do produto da reação de acilação do composto 4.

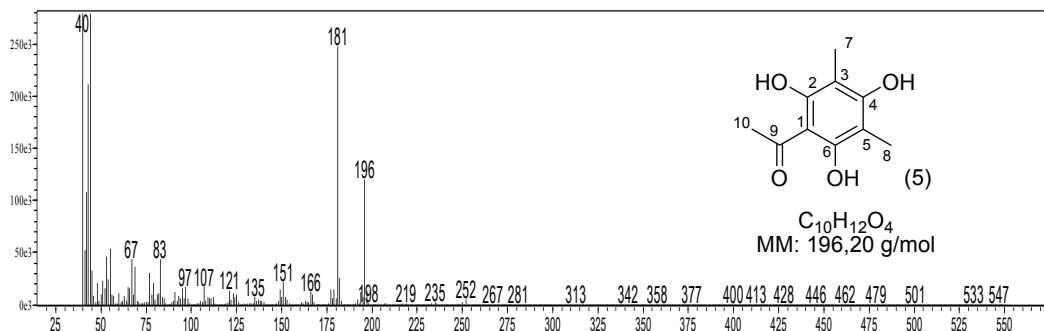


Fonte: autora

- Cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas

A Figura 41 mostra o espectro de massas do produto obtido na reação. Pode-se observar nesse espectro o pico do íon molecular (m/z 196) do composto 5.

Figura 41: Espectro de massas obtido por GC-EM do produto da reação de acilação do composto 4.



Fonte: autora

O cromatograma (CG-MS) do produto da reação apresentava vários subprodutos sendo o composto 5 o minoritário. Uma vez que se obteve quantidade muito pequena de produto reacional, não possibilitando a separação por cromatografia em coluna, repetiu-se a reação partindo-se do mesmo substrato 2,4-dimetilbenzeno-1,3,5-triol. Porém, pelas análises espectroscópicas de RMN foi observado que o composto 5 não foi obtido. Assim não foi possível sintetizar o composto 6 (2-acetyl-3,5,6-trihidroxi-4,6-dimethylciclohex-2,4-dienona). As Figuras 42 e 43 mostram os espectros de RMN de 1H e ^{13}C , respectivamente.

Figura 42: Espectro de RMN-¹H (400 MHz, DMSO) do produto da reação de acilação do composto 4.

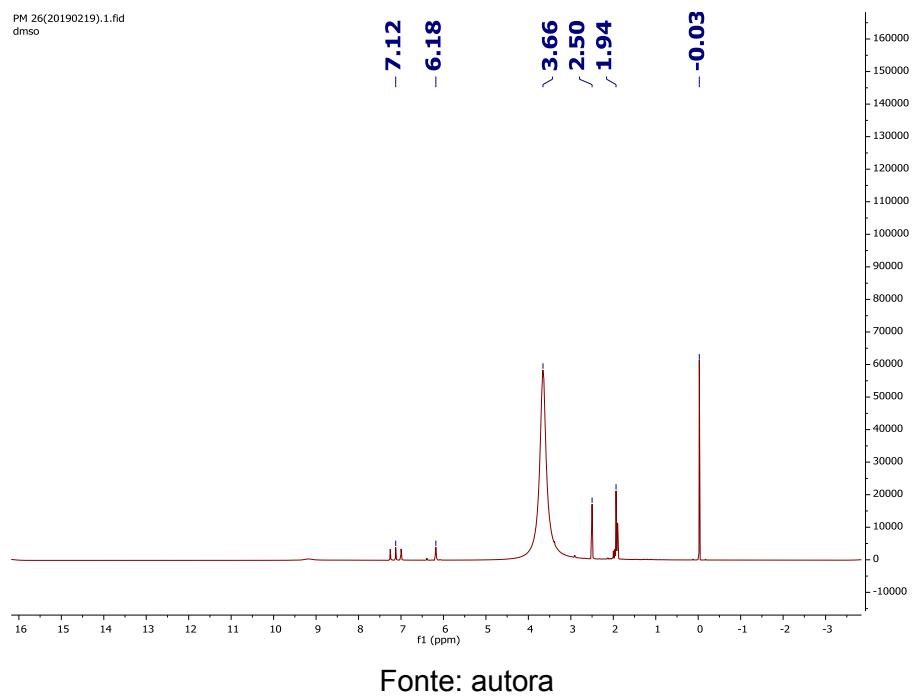
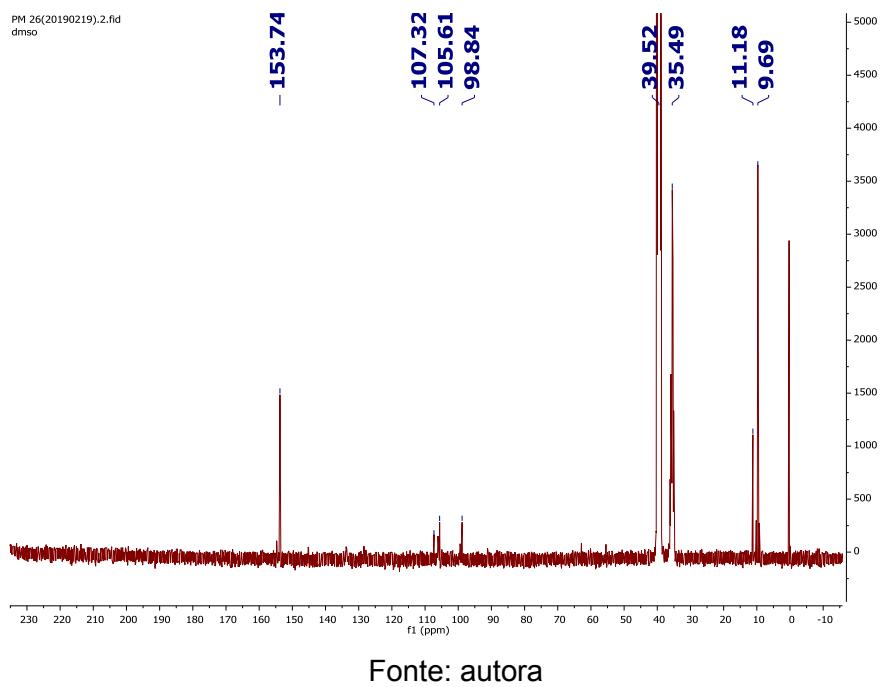
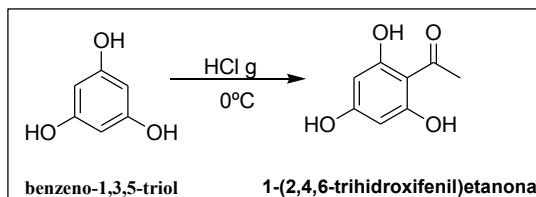


Figura 43: Espectro de RMN-¹³C(100 MHz, DMSO) do produto da reação de acilação do composto 4.



Como a reação não ocorreu, o procedimento de acilação utilizado (borbulhamento de ácido sulfúrico em ácido clorídrico gerando HCl gasoso) foi testado para o fluoroglucinol (benzeno-1,3,5-triol).

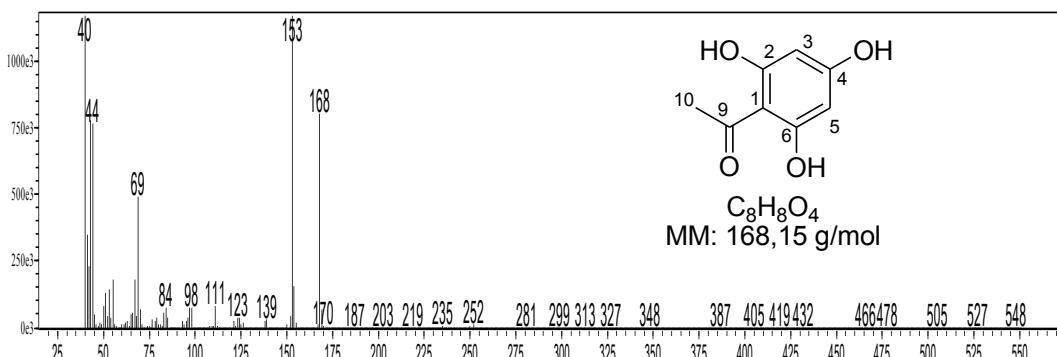
Figura 44: Reação de acilação do fluoroglucinol (benzeno -1,3,5-triol).



Fonte: autora.

A Figura 45 mostra o espectro de massas do produto obtido da acilação do fluoroglucinol, sendo observado o pico do íon molecular bem intenso em m/z 168.

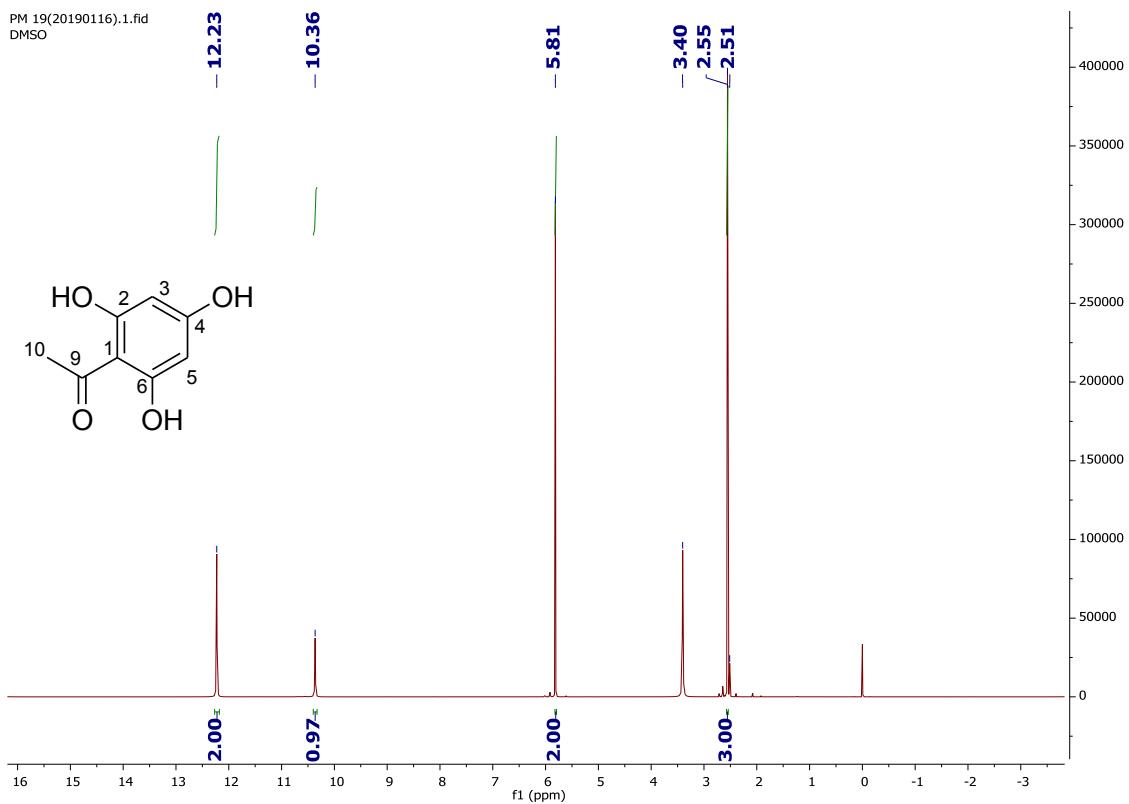
Figura 45: Espectro de massas obtido por GC-EM da fluoroacetofenona.



Fonte: autora.

A análise por RMN de ^1H , mostrada na Figura 46, também mostrou a presença do produto de acilação do fluoroglucinol. Observam-se os deslocamentos em δ : 2,51 ppm que se trata do solvente DMSO, em δ : 2,55 ppm os sinais dos 3 hidrogênios do grupo metila alfa à carbonila, em δ : 5,81 ppm referente aos 2 hidrogênios do anel aromático que possuem ambientes químicos idênticos, e os sinais dos grupos hidroxilas em δ : 12,23 ppm (de duas hidroxilas C2 e C6, como mostra a integração) e δ : 10,36 ppm (da outra hidroxila em C4), em δ : 3,40 ppm sendo o sinal sugerido com impureza, possivelmente água. Assim, o sinal do grupo metila alfa à carbonila é mais um indicativo que ocorreu a reação.

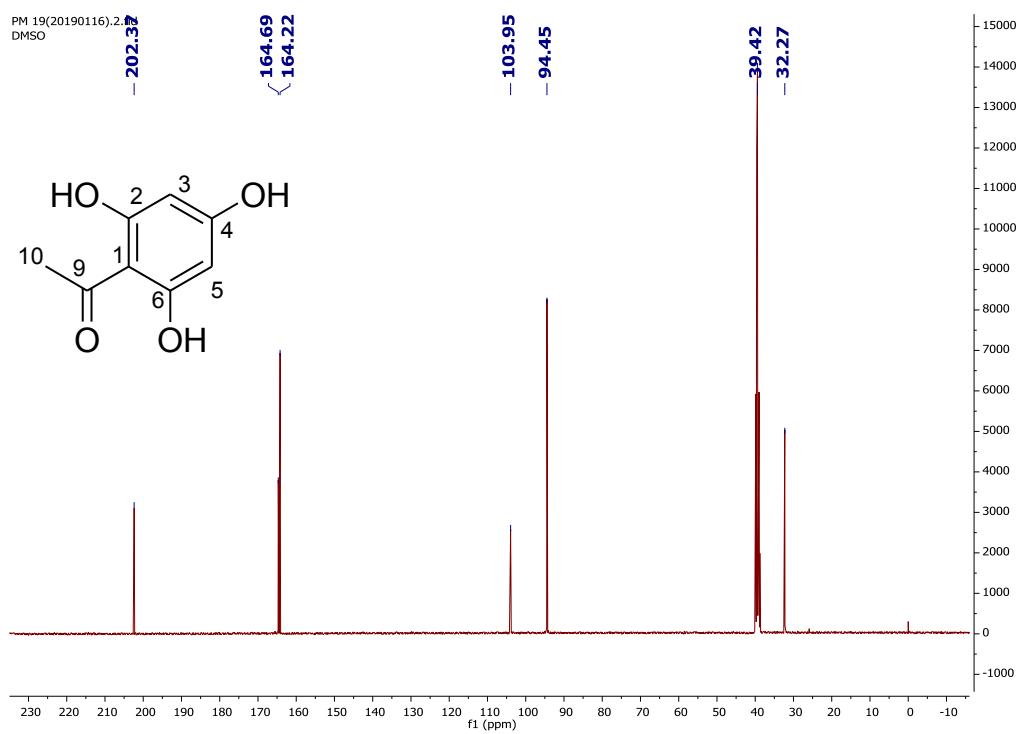
Figura 46: Espectro de RMN-¹H (400 MHz, DMSO) da fluoroacetofenona.



Fonte: autora

O espectro de RMN de ¹³C, mostrado na Figura 47, também mostra que a reação foi efetiva, como observado. O maior indicativo que a reação ocorreu é o sinal de deslocamento em δ : 202,37 ppm, característico de carbono de cetona, atribuído a C9. Também se observam o sinal atribuído ao carbono de metila alfa à carbonila, apresentando deslocamento em δ : 32,27 ppm. Além disso, é observado o sinal em δ : 39,42 ppm do solvente DMSO, e os outros quatro sinais dos demais carbonos: em δ : 164,69 ppm referente ao C1, δ : 164,22 ppm referente aos C2 e C6 (apresenta maior intensidade que C1 e mais desblindado por estar ligado ao grupo –OH, que é retirador de elétrons), δ : 103,95 ppm referente ao C4 e δ : 94,45 ppm referente aos C3 e C5 (apresenta maior intensidade que C4 e menos desblindado por não estar ligado ao grupo –OH).

Figura 47: Espectro de RMN-¹³C (100 MHz, DMSO) da fluoroacetofenona.



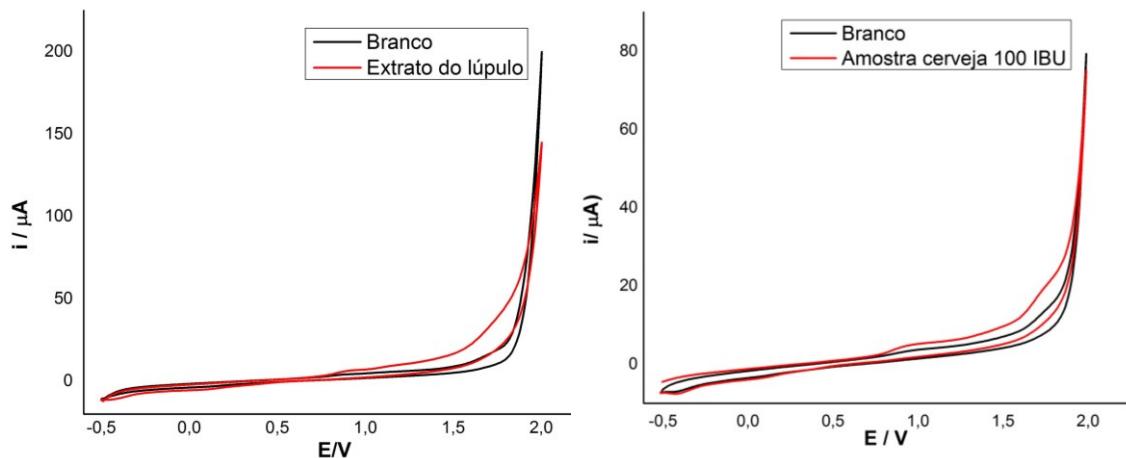
Fonte: autora

Assim verificou-se que as condições reacionais são propícias (como temperatura e tempo), bem como os reagentes e catalizador utilizados, porém o substrato torna a reação mais difícil porque provavelmente, o impedimento estérico (causado pelas duas metilas) dificulta a reação. Se faz necessária a busca por rotas alternativas para essa reação.

6.2 ANÁLISES ELETROQUÍMICAS

Na Figura 48 estão apresentados os voltamogramas obtidos por voltametria cíclica do lúpulo e extrato de cerveja 100 IBU, na qual pode ser observado um processo de oxidação irreversível no potencial de +1,2 V.

Figura 48: Voltamograma cíclico: respectivamente da adição do lúpulo e da cerveja.



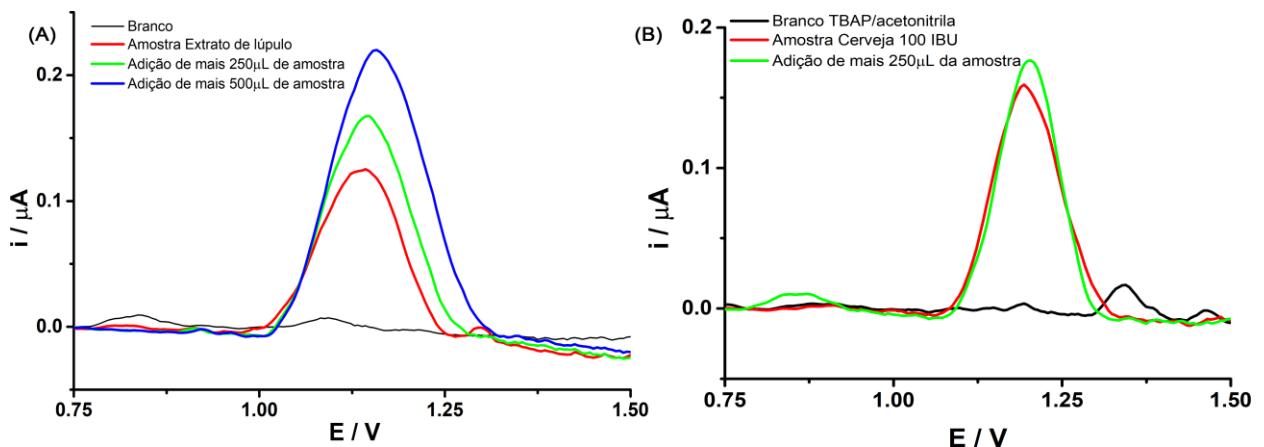
Nota: Velocidade de varredura: 50 mV; incremento de potencial: 5 mV. Eletrólito suporte: acetonitrila/TBAP 0,2 mol L⁻¹.

Fonte: autora.

Para obter uma melhor resolução do processo de oxidação, as amostras contendo α -ácido (cerveja com IBU 100 e extrato de lúpulo) foram analisadas por voltametria de onda quadrada (SWV) e voltametria de pulso diferencial (DPV), que são técnicas mais sensíveis. Entretanto para a SWV não foi observada à presença de pico de oxidação. Já utilizando DPV observou-se pico de oxidação a partir do potencial de +1,0 V como está apresentado na Figura 49.

A Figura 49 mostra os voltamogramas obtidos por voltametria de pulso diferencial para adições sucessivas de amostras de extrato de lúpulo (A) e cerveja (B), utilizando acetonitrila com perclorato de tetrabutilâmônio (TBAP) (0,2 mol L⁻¹) como eletrólito.

Figura 49: Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para amostras com concentrações crescentes de extrato de lúpulo e cerveja de 100 IBU.



Nota: Modulação da amplitude: 50 mV; incremento de potencial: 5 mV; tempo de modulação: 25 ms. Eletrólito suporte: acetonitrila/TBAP 0,2 mol L⁻¹.

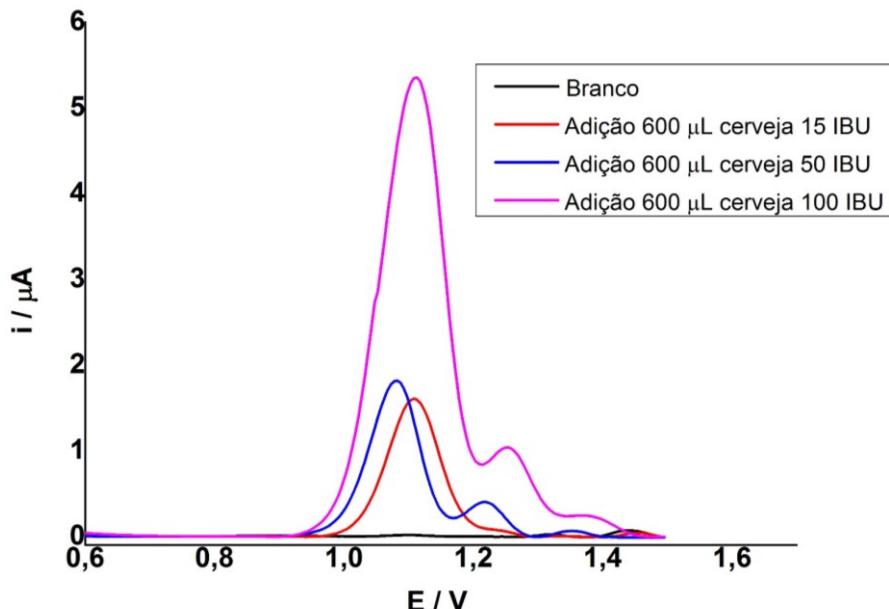
Fonte: autora.

Considerando que a cerveja e o extrato de lúpulo apresentam alfa-ácidos, os resultados apresentados mostram que a determinação eletroquímica de α -ácido é promissora utilizando a técnica de DPV.

Posteriormente novos estudos serão realizados para a otimização dos parâmetros a serem adotadas na DPV (tempo de modulação, incremento de potencial e modulação da amplitude). Além disso, serão realizadas a análise de cervejas com diferentes IBU e a molécula a ser sintetizada (6). Uma metodologia de quantificação será desenvolvida.

Nas mesmas condições citadas dos voltamogramas da Figura 49, foram feitas adições das cervejas de 15, 50 e 100 IBU, obtendo-se o voltamograma mostrado na Figura 50.

Figura 50: Voltamograma de adições de cerveja 15, 50 e 100IBU.



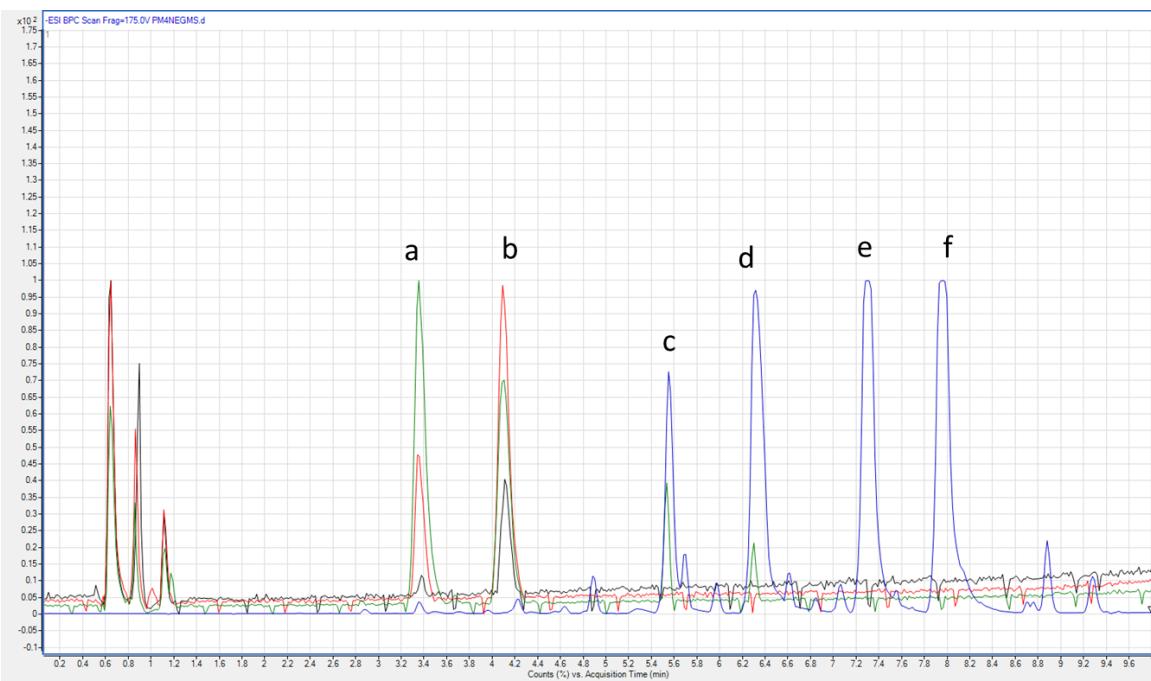
Fonte: autora.

Observa-se que todos oxidam em valores muito parecidos de potencial, além disso como observa-se que a cerveja de 100IBU apresenta corrente muito superior aos demais, mostrando que pode ter a presença de compostos que oxidam no mesmo potencial que os alfa-ácidos, ou que apresenta uma concentração bem superior e não identificada pela medida de IBU.

6.3 ANÁLISE DAS CERVEJAS E EXTRATO DE LÚPULO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLAE-EM)

Com a finalidade de correlacionar o grau de IBU de cervejas com a presença de α -ácidos, a análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas foi realizada com três cervejas e extrato de lúpulo. Na Figura 51 se encontra o cromatograma dessa análise (moléculas na Figura 52) e na Tabela 2 se encontram os dados da identificação por CLAE-MS.

Figura 51: Cromatograma (CLAE-EM) de α -ácidos: cervejas PM1 (linha preta), PM2 (linha vermelha) e PM3 (linha verde) e extrato do lúpulo (linha azul).

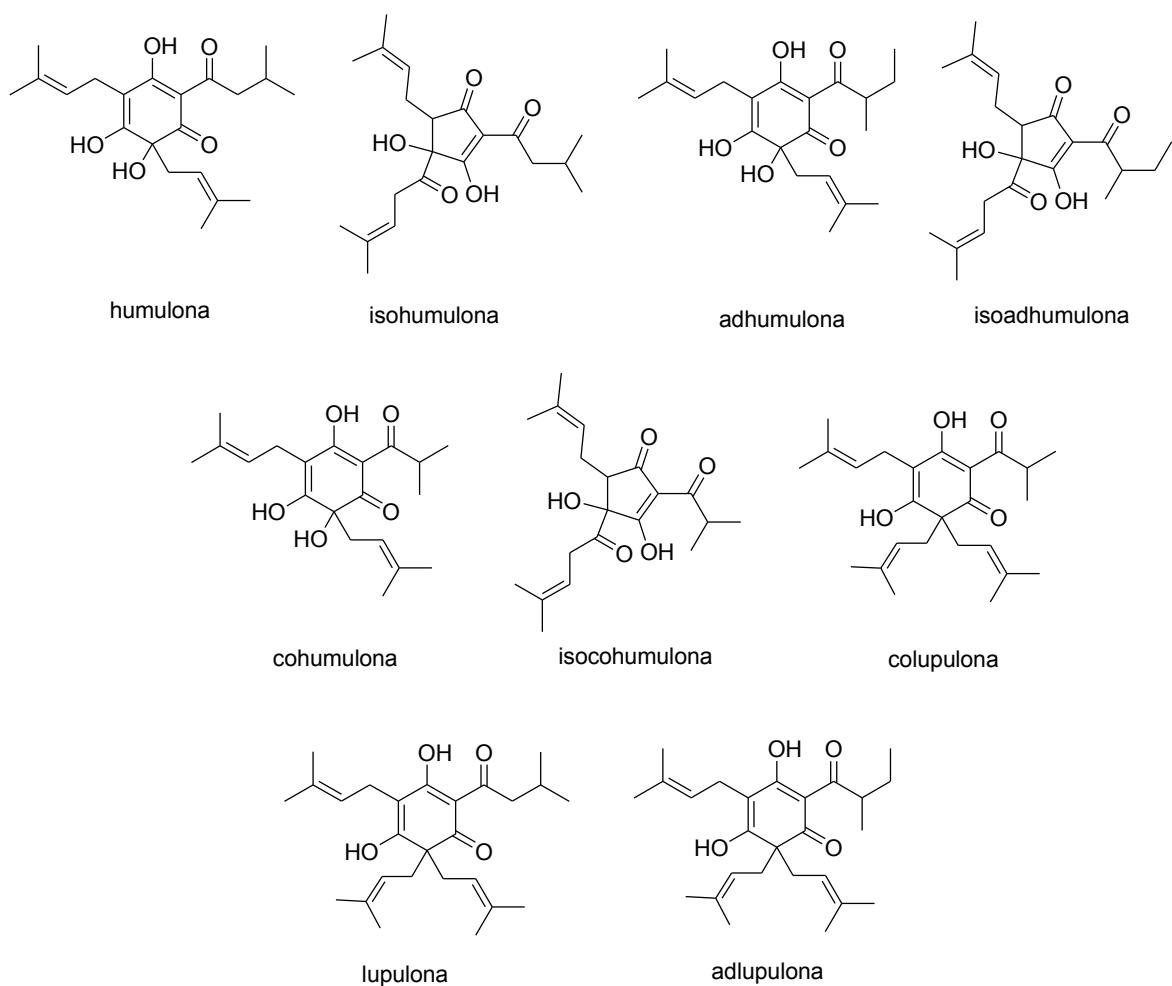


Nota: a= iso-cohumulona ; b= iso-ad/humulona; c= cohumulona ; d= ad/humulona; e= colupulone ; f= lupulone

Fonte: a autora.

As siglas se referem a: PM1 amostra de cerveja de IBU 15, PM2 amostra de cerveja de IBU 50; PM3 amostra de cerveja IBU 100.

Figura 52: Moléculas de α -ácidos e iso- α -ácidos identificadas por CLAE-EM nas cervejas e lúpulo.



Fonte: autora.

Tabela 2: Composição de α e β -ácidos presentes em amostras de cervejas (PM1, PM2, PM3) e lúpulo.

Composto	Amostras	Tempo de retenção (min)	[M-H] ⁻		Erro (ppm)	Fragmentação	Fórmula molecular
			Massa obtida	Massa calculada			
iso-cohumulona (a)	PM1	-	-	-	-	-	-
	PM2	3,360	347,1865	347,1864	-0,40	182; 209; 233; 251; 329	C ₂₀ H ₂₇ O ₅ ⁻
	PM3	3,363	347,1860	347,1864	1,13	182; 209; 233; 251; 329	C ₂₀ H ₂₇ O ₅ ⁻
	Lúpulo	-	-	-	-	-	-
iso-ad/humulona (b)	PM1	4,117	361,2022	361,2020	-0,52	196; 221; 247; 265; 343	C ₂₁ H ₂₉ O ₅ ⁻
	PM2	4,101	361,2020	361,2020	0	196; 221; 247; 265; 343	C ₂₁ H ₂₉ O ₅ ⁻
	PM3	4,101	361,2013	361,2020	1,96	196; 221; 247; 265; 343	C ₂₁ H ₂₉ O ₅ ⁻
	Lúpulo	-	-	-	-	-	-
cohumulona (c)	PM1	-	-	-	-	-	-
	PM2	-	-	-	-	-	-
	PM3	5,534	347,1856	347,1864	2,17	235; 278; 329	C ₂₀ H ₂₇ O ₅ ⁻
	Lúpulo	5,556	347,1868	347,1864	-1,17	235; 278; 329	C ₂₀ H ₂₇ O ₅ ⁻
ad/humulona (d)	PM1	-	-	-	-	-	-
	PM2	-	-	-	-	-	-
	PM3	6,301	361,2010	361,2020	2,78	249; 292; 343	C ₂₁ H ₂₉ O ₅ ⁻
	Extrato de Lúpulo	6,326	361,2021	361,2020	-0,24	249; 292; 343	C ₂₁ H ₂₉ O ₅ ⁻
colupulone (e)	PM1	-	-	-	-	-	-
	PM2	-	-	-	-	-	-
	PM3	-	-	-	-	-	-
	Lúpulo	7,302	399,2541	399,2514	-0,13	194; 219; 262; 330; 287; 355	C ₂₅ H ₃₅ O ₄ ⁻
lupulone (f)	PM1	-	-	-	-	-	-
	PM2	-	-	-	-	-	-
	PM3	-	-	-	-	-	-
	Lúpulo	7,961	413,2695	413,2697	0,68	233; 276; 301; 344; 369	C ₂₆ H ₃₇ O ₄ ⁻

Fonte: autora.

Através desses dados pode-se verificar que o grau de IBU acompanha a presença dos α -ácidos, ou seja, à medida que o IBU aumenta (PM1<PM2<PM3) observa-se o aumento de moléculas α -ácidos presentes nas cervejas. Além disso, verificou-se que o extrato do lúpulo não apresenta os iso- α -ácidos, uma vez que esses se formam apenas sob tratamento térmico na cerveja. As massas da adhumulona e humulona são iguais e até o momento não conseguimos identificar a diferença de ambos. Já a cohumulona se diferencia muito das adhumulona e humulona, por que apresentam diferentes padrões de fragmentação. As lupulonas e colupulonas (β ácidos) não aparecem na cerveja, por terem menor polaridade, mas já no extrato do lúpulo observa-se a presença delas.

7. CONCLUSÕES

Os voltamogramas mostraram que os α -ácidos são possíveis de serem detectados uma vez que apresentaram picos de oxidação, e a espectrometria de massas comprovou a presença deles no extrato de lúpulo e nas cervejas. A síntese até o composto 4 se mostrou como uma rota reproduzível, rápida e com pouca formação de subprodutos, e ainda com bom rendimento. Porém, a acetilação do composto 4 se mostrou ineficiente para ele, uma vez que para o fluoroglucinol essa reação possibilitou a acilação do anel aromático.

REFERÊNCIAS

- AGRA-GUTIÉRREZ, C.; HARDCASTLE, J. L.; BALL, J. C.; COMPTON, R. G. Anodic stripping voltammetry of copper at insonated glassy carbon-based electrodes: application to the determination of copper in beer. **Revista Analyst**, v.124, n. 7, p.1053-1057, 1999. <http://dx.doi.org/10.1039/A902974E>
- AIZEMBERG, R. Emprego de caldo de cana e do melado como adjunto de malte de cevada na produção de cervejas. 2015. 272 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, USP, Lorena, SP. 2015.
- ALMAGUER, C.; SCHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. *Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review*, **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289-314, 2014. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- ALMEIDA, N. E. C. Reatividade de iso- α -ácido e seus derivados hidrogenados frente ao radical 1-hidroxietila: implicação na perda de qualidade sensorial da cerveja. 2011. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Área de concentração: Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade de São Carlos, São Carlos, 2011.
- Andrés-Iglesias, C. ; Montero, O. ; Sancho, D.; Blanco, C. A. New trends in beer flavour compound analysis. **Society of Chemical Industry**, v. 95, n. 8, p. 1571-1576, 2015. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6905>
- BAMFORTH, C. W. Beer: tap into the art and science of brewing. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2003. 246p.
- BRASIL. Câmara dos Deputados. Decreto nº 6.871, de 4 de julho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a Padronização, a Classificação, o Registro, a Inspeção, a Produção e Fiscalização de Bebidas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 2009. Disponível em http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm.
- BRETT, A. M. O., BRETT, C. M. A.; Electroquímica: princípios, métodos e aplicações. Editora Oxford University, 1^a Edição, 1993.
- BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES; STEVENS, R. Brewing Science and practice. North America: CRC Press LLC, V1.2004

- BROWN, P. M.; HOWARD, G. A. 32. Chemistry of hop constituents. Part XIV. 2,4-Diacetyl-3,4-dihydroxy-5-methylcyclopent-2-enone, an analogue of isohumulone A. **Journal of the Chemical Society** (Resumed), n. 0, p. 164-166, 1960.
- CABALLERO, I.; BLANCO, C. A.; PORRAS, M. Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n. 1, p. 21-30, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.001>
- CAMPBELL, T. W.; COPPINGER, G. M. The synthesis and absorption spectra of some analogs of humulon. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, n. 4, p. 1849-1850, 1951. <https://doi.org/10.1021/ja01148a511>
- CATTOOR, K.; DRESEL, M.; DE BOCK, L.; BOUSSERY, K.; VAN BOCXLAER, J.; REMON, J.-P.; DE KEUKELEIRE, D.; DEFORCE, D.; HOFMANN, T.; HEYERICK, A. Metabolism of hop-derived bitter acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 33 p.7916-7924, 2013. <https://doi.org/10.1021/jf300018s>
- DE KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 108-112, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>
- ESTRACANHOLLI, E. S. Optical quantification of carbohidrates; ethanol in beer wort. 2012.142 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo – Instituto de Física de São Carlos, São Carlos, 2012.
- EßLINGER, H.M. **Handbook of Brewing: Process**, 1a. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2009, p. 200-250.
- JASKULA, B.; KAFARSKI, P.; AERTS, G.; COOMAN, L. A kinetic study on the isomerization of hop α -ácids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6408-6415, 2008. <https://doi.org/10.1021/jf8004965>
- KAPPLER, S.; KRAHL, M.; GEISSINGER, C.; BECKER, T; KROTTENTHALER, M. Degradation of iso- α -acids during wort boiling. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, n. 4, p. 332-338, 2010. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00783.x>
- MASEK, A.; CHRZESCIJANSKA, E.; KOSMALSKA, A. ZABORSKI, M. Characteristics of compounds in hops using cyclic voltammetry, UV–VIS, FTIR and GC–MS analysis, **Food Chemistry**, v. 156, p. 353-361, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.005>

MCMURRY, M. Química orgânica 6. Ed. São Paulo: v.1 Cengage Learning, 2005. 700p.

Mercado cervejeiro [2018]. Disponível em:

http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/mercado-cervejeiro/. Acesso em: 01/09/2018.

Microcervejarias [2018] Disponível em:

<http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/microcervejarias-ganham-espaco-no-mercado-nacional,fbe9be300704e410VgnVCM1000003b74010aRCRD>.

Acesso em 10/10/ 2018.

MORADO, R. Larousse da Cerveja. 1^a ed. São Paulo: Editora Lafonte Ltda., 2009.

NEGRI, G.; di SANTI, D.; TABACH, R. Bitter acids from hydroethanolic extracts of *humulus lupulus L.*, Cannabaceae, used as anxiolytic. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 850-859, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000051>

NERY, E.W.; KUBOTA, L.T. Integrated, paper-based potentiometric electronic tongue for the analysis of beer and wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 918, p. 60-68, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.004>

OLIVEIRA-NETO, J. R.; MACÊDO, I. Y. L.; DE OLIVEIRA, N. R. L.; FERREIRA, R. Q.; GIL, E. S. Antioxidant capacity and total phenol content in hop and malt commercial samples. **Electroanalysis**, v. 29, p. 2788-2792, n. 12, 2017. <https://doi.org/10.1002/elan.201700492>

PACHECO, W. F.; Semaan, F. S.; Almeida, V. G. K.; Ritta, A. G. S. L.; Aucélio, R. Q. Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introdução à espectroscopia. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010, 700p.

PINHEIRO, T. R. Obtenção de Compostos com Ação Biológica através da Síntese e Modificação Estrutural de Produtos Naturais. Estudo de Correlação Estrutura-Atividade. 2004 122 f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de ciências, físicas e matemáticas, Departamento de química, UFSC Florianópolis, SC, 2006.

PINTO, M. B. C. Isomerização de ácidos amargos de lúpulo cascade cultivado no Brasil e seu desempenho durante a fermentação da cerveja. 2018 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de engenharia de alimentos, Unicamp, São Carlos, SP 2018.

REINOLD, M. R. Manual prático de cervejaria. São Paulo: Aden, 1997.214p.

RICO-YUSTE, A.; GONZÁLEZ-VALLEJO, V.; BENITO-PEÑA, E.; ENGEL, T. DE LAS CASAS, ORELLANA, G.; MORENO-BONDI*, M. C. Furfural determination with disposable polymer films and smartphone-based colorimetry for beer freshness assessment. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 7, p. 3959–3966, 2016.

<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00167>

SASAOKA, N.; SAKAMOTO, M.; KANEMORI, S.; KAN, M. TSUKANO, C. ; TAKEMOTO, Y., KAKIZUKA, A. Long-term oral administration of hop flower extracts mitigates alzheimer phenotypes in mice. **Plos One**, v. 9, n.1, e87185, 2014.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087185>

SHI, L.; FENG , X. E.; CUI , J. R.; FANG, L. H.; DU, G. H.; LI, Q. S. Synthesis and biological activity of flavanone derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 18, p. 5466-5468, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.07.090>

Sigma Aldrich Cátalago [2018]. Disponível em:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/50247?lang=pt®ion=BR>.
Acesso em 12/11/2018.

SILVA, W. Determinação simultânea de propifenazona, paracetamol e cafeína, utilizando eletrodo de diamante dopado com boro. 2017 80f. Dissertação (Mestrado em química) – Instituto de química, UFU, Uberlândia, MG, 2017.

TERASHIMA, C.; RAO, T. N.; SARADA, B. V.; KUBOTA, Y.; FUJISHIMA, A. Direct electrochemical oxidation of disulfides at anodically pretaeted boron-doped diamond electrodes. **Analytical Sciences**. v.75, n.7, p 773-780, 2003.

<https://doi.org/10.1021/ac020583q>

THERMO FISHER SCIENTIFIC. Application Note - Gradient HPLC Method for Analysis of Beer Polyphenols, Proanthocyanidins, and Bitter Acids Using a Novel Spectro-Electro Array Platform. Disponível em:

<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/AN-1065-Gradient-HPLC-Analysis-Beer-Spectro-Electro.pdf>. Acesso em 02/02/2017.

VANHOECKE, B.; DERYCKE, L.; VAN MARCK, V.; DEPYPERE, H.; DE KEUKELEIRE, D. BRACKE M. Antiinvasive effect of xanthohumol, a prenylated chalcone present in hops (*Humulus Lupulus L.*) and beer. **International Journal of Cancer**. v.117, n.6, p. 889-895, 2005. <https://doi.org/10.1002/ijc.21249>

VENTURINI-FILHO, W. G. Bebidas Alcoólicas – Ciência e Tecnologia. 2^a Edição, Volume 1, Editora: Blucher, 2016.

VERZELE, M.; DE KEUKELEIRE, D. Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids. Amsterdam: Elsevier, 1991.417p. Volume 22, Issue 4, 2014, Pages 413-417, ISSN 1021-9498.