

Luis Augusto da Silva

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS UTILIZANDO
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ALIADA A QUIMIOMETRIA PARA
ANÁLISE DE CERVEJAS NACIONAIS**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Araraquara-SP

2021

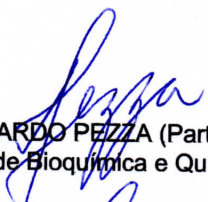
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Desenvolvimento de metodologia analítica utilizando Ressonância Magnética Nuclear aliada a Quimiometria para análise de cervejas nacionais"

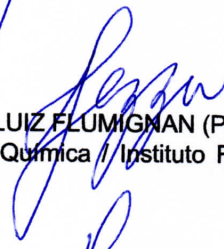
AUTOR: LUIS AUGUSTO DA SILVA

ORIENTADOR: LEONARDO PEZZA

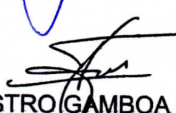
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. LEONARDO PEZZA (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara


Prof. Dr. IVO MILTON RAIMUNDO JUNIOR (Participação Virtual)
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas


Prof. Dr. DANILO LUIZ FLUMIGNAN (Participação Virtual)
Departamento de Química / Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Mato Grosso - IFMT - Cuiabá.


Prof. Dr. ORLANDO FATIBELLO FILHO (Participação Virtual)
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - São Carlos


Prof. Dr. IAN CASTRO GAMBOA (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 08 de março de 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

S586d Silva, Luis Augusto da
Desenvolvimento de metodologia analítica utilizando
ressonância magnética nuclear aliada à quimiometria para
análise de cervejas nacionais / Luis Augusto da Silva. –
Araraquara : [s.n.], 2021
89 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Leonardo Pezza

1. Ressonância magnética nuclear. 2. Análise de
componentes principais. 3. Quimiometria. 4. Cervejarias.
5. Cervejas - Indústrias. I. Título.

DADOS PESSOAIS

Nome: Luis Augusto da Silva

Filiação: Silvia Elena Correa da Silva e Luis Carlos da Silva

Data de nascimento: 27/12/1988

Naturalidade: Santa Cruz das Palmeiras-SP

Nacionalidade: Brasileiro

e-mail: gutofms15@gmail.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA

GRADUAÇÃO (2007-2012): Universidade Federal de Alfenas-MG (UNIFAL)

Curso: Química Bacharelado com atribuições tecnológicas.

PÓS-GRADUAÇÃO (2015-2016): Universidade Federal de São Carlos (UFSCar)

Curso: Mestrado

Área: Físico-Química

Bolsista: CAPES

Título da Dissertação: Dinâmica de colisões eletrônicas com moléculas orgânicas voláteis: seções de choque de ionização e diferenciais elásticas

Orientador: Prof. Dr. Manoel Gustavo Petrucelli Homem

PÓS-GRADUAÇÃO (2017-2021): Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

Curso: Doutorado

Área: Química Analítica

Bolsista: CNPq

Título da Tese: Desenvolvimento de Metodologias analíticas utilizando Ressonância Magnética Nuclear aliada a Quimiometria para análise de cervejas nacionais

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Pezza

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS NA FORMA DE PAINEL

Título: Elastic electron scattering from formamide.

Evento: XIII Workshop de Física Molecular e Espectroscopia, 2016, Rio de Janeiro.

Título: Electron impact ionization of tetrahydrofuran.

Evento: XIII Workshop de Física Molecular e Espectroscopia, 2016, Rio de Janeiro.

Título: ^1H NMR spectroscopy combined with multivariate data analysis for classification of Brazilian lager beer.

Evento: 19º Encontro Nacional de Química Analítica e 7º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas-GO.

Título: Simultaneous determination of caffeine and taurine in energy drinks by ^1H NMR.

Evento: 19º Encontro Nacional de Química Analítica e 7º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas-GO

PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSO E WORKSHOP

XIII Workshop de Física Molecular e Espectroscopia, 2016, Rio de Janeiro.

Workshop de Quimiometria aplicada a Ressonância Magnética Nuclear, 2017. EMBRAPA, São Carlos-SP.

19º Encontro Nacional de Química Analítica e 7º Congresso Iberoamericano de Química Analítica, 2018, Caldas Novas-GO.

Métodos Quimiométricos de Classificação: Aplicações em Química de Alimentos. Carga horária: 4 horas. Ministrante: Prof. Dr. Marcelo Martins de Sena (UFMG), 2018, Caldas Novas-GO.

Workshop de Quimiometria e Bioenergia, 2019, IQ-UNESP Araraquara-SP.

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERÍODICOS

1 DA SILVA, LUIS AUGUSTO; FLUMIGNAN, DANILO LUIZ; TININIS, ARISTEU GOMES; PEZZA, HELENA REDIGOLO; PEZZA, LEONARDO. Discrimination of Brazilian lager beer by ^1H NMR spectroscopy combined with chemometrics. **FOOD CHEMISTRY**, v. 272, p. 488-493, 2019.

2 DA SILVA, LUIS AUGUSTO; FLUMIGNAN, DANILO LUIZ; PEZZA, HELENA REDIGOLO; PEZZA, LEONARDO. ^1H NMR spectroscopy combined with multivariate data analysis for differentiation of Brazilian lager beer according to brewery. **EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY**, v. 245, p. 2365-2372, 2019.

3 WOLFF, W.; RUDEK, B. ; **DA SILVA, L. A.;** HILGERS, G. ; MONTENEGRO, E. C.; HOMEM, M. G. P. Absolute ionization and dissociation cross sections of tetrahydrofuran: Fragmentation-ion production mechanisms. **JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS**, v. 151, p. 064304, 2019.

4 BUK, MARIANA VALIN; BARDELA, FERNANDA PILLA; **SILVA, LUIS AUGUSTO;** IGA, I; HOMEM, MANOEL GUSTAVO PETRUCELLI. Elastic electron scattering from formamide. **JOURNAL OF PHYSICS B-ATOMIC MOLECULAR AND OPTICAL PHYSICS**, v. 51, p. 095201, 2018.

5 SOUZA, G. L. C.; **DA SILVA, LUIS A.;** SOUSA, W. J. C.; SUGOHARA, R. T.; IGA, I.; SANTOS, A. S.; MACHADO, L. E.; HOMEM, M. G. P.; BRESCANSIN, L. M.; LUCCHESI, R. R.; LEE, M. T. Electron collisions with small esters: A joint experimental-theoretical investigation. **PHYSICAL REVIEW A**, v. 93, p. 032711, 2016.

6 SILVA, L. A.; MATA, V. A. S. ; SOUZA, G. L. C.; IGA, I.; MACHADO, L. E.; LUCCHESI, R. R.; LEE, M. T.; HOMEM, M. G. P. Electron interaction with dimethyl disulfide in the low- and intermediate-energy range. **PHYSICAL REVIEW A**, v. 94, p. 052704, 2016.

7 HOMEM, M. G. P.; IGA, I.; **SILVA, L. A.**; SOUZA, G. L. C.; MACHADO, L. E.; BRESCANSIN, L. M.; MATA, V. A. S.; LUCCHESI, R. R.; LEE, M. T. Theoretical and experimental investigation of electron collisions with acetone. **PHYSICAL REVIEW A**, v. 92, p. 032711, 2015.

8 ALVARENGA, BRUNO G.; VIRTUOSO, LUCIANO S.; LEMES, NELSON H. T.; **DA SILVA, LUIS A.**; MESQUITA, ANDERSON F.; NASCIMENTO, KELANY S.; HESPANHOL DA SILVA, MARIA C.; MENDES DA SILVA, LUIS H. Measurement and Correlation of the Phase Equilibrium of Aqueous Two-Phase Systems Composed of Polyethylene(glycol) 1500 or 4000 + Sodium Sulfite + Water at Different Temperatures. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 59, p. 382-390, 2014.

ATIVIDADES ACADÊMICAS RELEVANTES

Estágio docência na disciplina: Química Orgânica Experimental

Supervisor: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Carga horária: 60 horas

Turma: Farmácia **Período:** 1º semestre de 2018

Estágio docência na disciplina: Química Orgânica Experimental

Supervisor: Prof. Dr. Leonardo Pezza

Carga horária: 60 horas

Turma: Química Licenciatura **Período:** 2º semestre de 2018

REVISOR DE PERÍODICOS

(2019 – Atual) Periódico: Physica Scripta

(2019 – Atual) Periódico: Journal of Physics Communications

DEDICATÓRIA

Não há exemplo maior de dedicação do que o da nossa família. À minha querida família, que tanto admiro, dedico o resultado do esforço realizado ao longo deste percurso.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela saúde e sabedoria para conduzir este trabalho até o final, diante de todos os desafios que foram apresentados durante esta longa jornada, especialmente neste ano atípico de 2020.

A minha família que sempre me apoiou e incentivou.

A minha esposa, companheira, amiga, conselheira Tânia Alves.

A todos os companheiros de laboratório do Grupo de Pesquisa Fritz Feigl.

Ao Prof. Dr. Danilo Flumignan, Prof^a. Dr^a. Maysa Furlan e Prof^a. Dr^a Helena Pezza pelas produtivas contribuições.

Ao Dr. Nivaldo Boralle e Dr^a. Lucinéia Vizzotto pelo trabalho de excelência e suporte técnico indispensável.

A todos do laboratório de Controle de Qualidade do Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos.

Ao Prof. Dr. Leonardo Pezza pela orientação, conselhos, confiança, respeito e atenção, muito obrigado por tudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica e Química Orgânica.

Ao CNPq pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A cerveja é uma bebida bastante apreciada pela população brasileira e isso fez com que o setor produtivo da mesma tenha crescido exponencialmente nos últimos anos. Neste contexto, a produção de cerveja no Brasil é de cerca de 13,5 bilhões de litros por ano colocando a indústria brasileira no terceiro lugar do ranking mundial. Contudo, simultaneamente a essa expansão mencionada tem sido identificados alguns procedimentos fraudulentos como substituição de rótulos e tampas de garrafas de menor preço e de reconhecimento comercial. Dessa forma, esse trabalho visou empregar espectroscopia de RMN de ^1H combinada com a quimiometria a fim de discriminar amostras de cerveja lager de duas classes diferentes, de acordo com seu estilo e informações fornecidas no rótulo. Os métodos quimiométricos consistiram na análise de componentes principais (PCA), análise discriminante de mínimos quadrados parciais (PLS-DA), e modelagem independente suave de analogias de classe (SIMCA). Os espectros de RMN de ^1H foram avaliados, mas apenas a região alifática (0–3 ppm) foi utilizada para análise multivariada. Os resultados evidenciaram que no estudo PCA (os três primeiros componentes explicaram 81,5% da variabilidade do conjunto de dados), os modelos PLS-DA e SIMCA provaram ser uma ferramenta poderosa com poder de previsão superior a 90% para distinguir cervejas lager com base nas matérias-primas empregadas no processo de fabricação de cerveja. Assim, a espectroscopia de RMN de ^1H em conjunto com os métodos quimiométricos podem ser considerados ferramentas importantes para a análise de matrizes de bebida alcóolicas como as cervejas.

Palavras-chave: Cerveja; Ressonância; Quimiometria; PCA; PLS-DA; SIMCA.

ABSTRACT

Beer is a beverage that is very appreciated by the Brazilian population and this has caused the production sector to grow exponentially in recent years. In this context, beer production in Brazil is around 13.5 billion liters per year, placing Brazilian industry in the third place in the world ranking. However, at the same time as the aforementioned expansion, some fraudulent procedures have been identified, such as replacing lower-priced labels and bottle caps and commercial recognition. Thus, this work aimed to employ ^1H NMR spectroscopy combined with chemometry in order to discriminate samples of lager beer from two different classes, according to their style and information provided on the label. The chemometric methods consisted of principal component analysis (PCA), discriminant analysis of partial least squares (PLS-DA), and smooth independent modeling of class analogies (SIMCA). The ^1H NMR spectra were evaluated, but only the aliphatic region (0–3 ppm) was used for multivariate analysis. The results showed that in the PCA study (the first three components explained 81.5% of the variability of the data set), the PLS-DA and SIMCA models proved to be a powerful tool with more than 90% predictive power to distinguish lager beers with based on the raw materials used in the brewing process. Thus, ^1H NMR spectroscopy in conjunction with chemometric methods can be considered important tools for the analysis of alcoholic beverage matrices such as beers.

Keywords: Beer; Resonance; Chemometrics; PCA; PLS-DA; SIMCA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa geográfico da Mesopotâmia e civilização dos sumérios, babilônios.	19
Figura 2- Produção de cerveja nos mosteiros: cervejas Trapistas	20
Figura 3- Número de cervejarias legalmente registradas no MAPA.....	22
Figura 4- Número de cervejarias por estados do Brasil	22
Figura 5 Processo de malteação: 1- Cevada umidecida, 2- Germinação, 3- Torrefação para inibir germinação	25
Figura 6- Diferentes tipos de maltes e diferentes níveis de torras.....	26
Figura 7- O lúpulo e a representação da estrutura vegetal de armazenamento de resina de lúpulo	27
Figura 8- Representação ilustrativa da fermentação alcoólica do mosto cervejeiro. .	28
Figura 9- Ilustração dos dois tipos mais comuns de fermentação de cerveja: ale e lager	33
Figura 10- Espectro eletromagnético e RMN	36
Figura 11- Níveis de energia nuclear de spin	38
Figura 12- Precessão do núcleo devido à influência de um campo magnético	39
Figura 13- Blindagem nuclear	43
Figura 14- Representação da transformação do FID de domínio do tempo para domínio de frequência.	45
Figura 15- Representação ilustrativa da análise de componentes principais (PCA) .	47
Figura 16- Representação do modelo de PLS1-DA	49
Figura 17- Representação do modelo de PLS2-DA	49
Figura 18- Esquema de amostragem: Escolha do fabricante, tipo e estilo de cerveja, a marca, o tipo de embalagem, o lote e o prazo de validade.	54
Figura 19- Ilustração do procedimento de preparo de amostra de cerveja para análise em RMN de ^1H	55
Figura 20- (a) Espectrômetro Avance 600 e a (b) sonda criogênica	56
Figura 21- Ilustração do procedimento de alinhamento espectral em três etapas: 1ª etapa: sobreposição, 2ª etapa: segmentação e 3ª etapa: alinhamento segmentar...	58
Figura 22- Espectros de RMN de ^1H para amostras de cerveja (n=40). Espectro de RMN de ^1H de 0-10 ppm	62
Figura 23- Região anomérica (4,95 ppm) associada a maltooligossacarídeos e dextrinas.....	65

Figura 24- Gráfico de scores da PCA de amostras de cerveja (n=40). ● Premium American Lager, ● Standard American Lager.	66
Figura 25- Gráfico de scores de PCA tridimensional. ● Premium American Lager, ● Standard American Lager.....	67
Figura 26- Gráfico de loadings das componentes principais PC1 e PC2. Em destaque região de seleção de variáveis. Regiões destacadas são desconsideradas através de seleção de variáveis.	68
Figura 27- Resultado de análise discriminante obtida pela PLS-DA para conjunto de calibração e previsão	69
Figura 28- Espectro de RMN de ^1H para cerveja do estilo Standard American. Ampliação da região alifática (0-3 ppm).	72
Figura 29- Ilustração do procedimento de alinhamento espectral. a) sinal em 1,34 ppm antes do alinhamento e b) sinal em 1,34 ppm após o alinhamento.....	73
Figura 30- Gráfico de escores de PCA para todo o espectro (δ 0,0 a 9,0 ppm). PC1 x PC2 das amostras de cerveja lager. ● Esferas azuis: Ambev; ● Esferas verdes: Heineken; ● Esferas vermelhos: Grupo Petrópolis.....	74
Figura 31- Gráfico de escores de PCA para a região de açúcar (δ 3,0 a 6,0 ppm). PC1 x PC2 das amostras de cerveja lager. ● Esferas azuis: Ambev; ● Esferas verdes: Heineken; ● Esferas vermelhos: Grupo Petrópolis.....	75
Figura 32- Gráfico de escores de PCA para a região do composto aromático (δ 6,0 a 9,0 ppm). PC1 x PC2 das amostras de cerveja lager. ● Esferas azuis: Ambev; ● Esferas verdes: Heineken; ● Esferas vermelhos: Grupo Petrópolis.....	75
Figura 33- Gráfico de scores da PCA para região dos compostos alifáticos. ● Esferas azuis: Ambev; ● Esferas verdes: Heineken; ● Esferas vermelhos: Grupo Petrópolis.....	76
Figura 34- Gráfico de loadings das componentes principais PC1 e PC2. 1- álcoois, 2- ácido láctico, 3- alanina, 4- ácido acético e 5- ácido pirúvico. Regiões destacadas são desconsideradas através de seleção de variáveis.	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Descrição da composição química da água cervejeira	24
Quadro 2 Histórico da evolução da ressonância magnética nuclear	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Relação entre spin nuclear (I) e núcleos ativos no RMN.....	37
Tabela 2 - Deslocamentos químicos típicos para cada tipo de prótio.	41
Tabela 3- Relação entre eletronegatividade (EN) do substituinte (X) e deslocamento químico (δ).....	42
Tabela 4- Efeito do substituinte eletronegativo e a distância	42
Tabela 5- Resultado da tabela de contingência para modelos quimiometricos.....	51
Tabela 6- Atributos físico-químicos de cervejas brasileiras do tipo lager de estilos diferentes (n=40).	64
Tabela 7- Resultados obtidos com os modelos PLS-DA e SIMCA.....	70
Tabela 8- Assinalamento dos sinais de RMN de ^1H para amostras de cerveja.....	72
Tabela 9- As atribuições de classe obtidas com o modelo PLS-DA.....	78
Tabela 10- As atribuições de classe obtidas com o modelo SIMCA	79
Tabela 11 - Sensibilidade e Especificidade para os modelos PLS-DA SIMCA	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato

FN – Falso negativo

FP – Falso Positivo

FT - Transformada de Fourier, do inglês Fourier transform

FOM – Figuras de Mérito, do inglês Figure of Merit

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NOE – Efeito nuclear de Overhauser

PC - Componentes principais, do inglês Principal Components.

PCA - Análise por componentes principais, do inglês Principal Component Analysis

PLS - Mínimos quadrados parciais, do inglês Partial Least Squares

PLS-DA - Mínimos quadrados parciais para análise discriminante, do inglês Partial Least Squares Discriminant Analysis

RSPA – Alinhamento de pico segmentar recursivo, do inglês Recursive Segment-wise Peak Alignment

SIMCA - Modelagem independente e flexível por analogia de classes, do inglês Soft Independent Modeling of Class Analogys

TMS - Tetrametilsilano

TSP - Ácido trimetilsililpropanóico, do inglês Trimethylsilylpropanoic acid

VL – Variável Latente

VN – Verdadeiro negativo

VP – Verdadeiro positivo

B₀ - Campo magnético aplicado

δ - Deslocamento químico

ω - Frequência angular

h - Constante de Planck

v - Frequência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	A ORIGEM DA CERVEJA	19
1.2	A CERVEJA NO MUNDO	20
1.3	A CERVEJA NO BRASIL	21
1.4	INGREDIENTES CERVEJEIROS	23
1.4.1	Água	23
1.4.2	Malte	25
1.4.3	Lúpulo	26
1.4.4	Levedura	27
1.4.5	Adjuntos	29
1.5	ETAPAS DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE CERVEJA	30
1.5.1	Mosturação	30
1.5.2	Fermentação	31
1.5.3	Maturação	32
1.6	TIPOS E ESTILOS DE CERVEJA.....	32
1.6.1	Ale.....	33
1.6.2	Lager.....	33
1.7	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	34
1.7.1	Aspectos gerais.....	34
1.8	QUIMIOMETRIA.....	44
1.9	PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H	44
1.10	MÉTODOS QUIMIOMETRICOS	45
1.10.1	Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis, PCA)	46
1.10.2	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (Partial Least Square Discriminant Analysis, PLS-DA).	48
1.10.3	Modelagem independente e flexível de analogia de classe (SIMCA).	49

1.11	VALIDAÇÃO ANALÍTICA MULTIVARIADA.....	50
1.11.1	Seleção de amostras.....	51
1.11.2	Seleção de variáveis	51
1.11.3	Figuras de méritos	51
2	OBJETIVOS.....	53
3	MATERIAIS E METODOLOGIA	54
3.1	AMOSTRAGEM.....	54
3.2	MEDIDAS DE POTENCIAL HIDROGENIÔNICO	54
3.3	PREPARO DE AMOSTRAS	55
3.4	ESPECTROS DE RMN DE ^1H	55
3.5	ALINHAMENTO ESPECTRAL	57
3.6	CONSTRUÇÃO DA MATRIZ DE DADOS	58
3.7	PRÉ-TRATAMENTOS DOS DADOS	59
3.7.1	Processamento dos dados.....	59
3.7.2	Normalização	59
3.7.3	Escalonamento	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	61
4.1	DIFERENCIAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE CERVEJAS LAGER DE DIFERENTES ESTILOS	61
4.2	DIFERENCIAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE CERVEJAS LAGER DO MESMO ESTILO (STANDARD AMERICAN LAGER) POR CERVEJARIA.....	71
5	CONCLUSÃO	82
6	REFERÊNCIAS.....	83

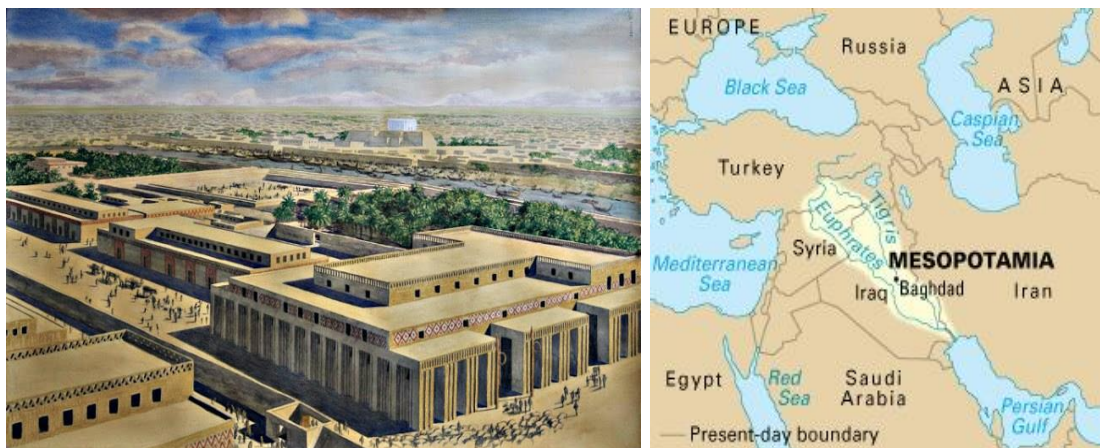
1 INTRODUÇÃO

1.1 A ORIGEM DA CERVEJA

A origem da cerveja é cercada de mistérios. Há varias hipóteses a respeito de como e quando ela tenha surgido. Algumas evidências e descobertas de artefatos, levam a crer que tenha surgido a 6000 a.C na região da Mesopotâmia (Figura 1), essa região era povoada pelos sumérios, babilônios e egípcios (HORNSEY, 2003).

Neste período a população se empenhava nos processos agrícolas que culminaram na produção de cereais. A principal hipótese é que durante um período chuvoso, os agricultores poderiam ter deixado parte da sua colheita exposta à umidade proveniente da água da chuva, e os grãos umedecidos foram transformados uma solução pastosa rica em carboidratos. Posteriormente, essa solução foi fermentada por ação de leveduras selvagens dispersas no ar (BAMFORTH, C.W., 2017).

Figura 1 Mapa geográfico da Mesopotâmia e civilização dos sumérios, babilônios.



Fonte: Adaptado de (HORNSEY, 2003)

O resultado deste processo espontâneo instigou a curiosidade das pessoas, que resolveram provar aquela bebida opaca com aroma atraente. Satisfeitos com a experiência organoléptica, passaram a repetir o processo mesmo sem compreender ao certo como ele ocorria.

Como esses grãos fornecem uma fonte útil de carboidratos e proteínas, fáceis de manusear e poderiam ser armazenados por longos períodos, rapidamente

se tornaram um grande objeto de interesse e inovação. Desta forma, esses são os relatos da origem da bebida semelhante, que originou o que nós chamamos hoje de cerveja.

1.2 A CERVEJA NO MUNDO

O interesse pela cerveja sempre foi bastante acentuado e se expandiu, ao longo dos séculos, principalmente no Oriente Médio. Os egípcios consideravam a cerveja não apenas uma bebida, mas também um produto com propósitos religiosos e médicos, e acredita-se que os egípcios ensinaram a arte da cerveja aos gregos e aos romanos.

Embora considerada menos importante do que o vinho, a produção de cerveja evoluiu durante o período do domínio romano, sendo principalmente produzida nas áreas externas do Império Romano (DIGHE, 2016).

Durante a Idade Média, os religiosos (monges, cristãos) preservaram o processo de fabricação de cerveja como um ofício e alcançaram vários avanços no processo de produção, incluindo melhores técnicas de armazenamento e o uso de lúpulo. As cervejas produzidas dentro dos mosteiros são chamadas de cervejas Trapistas. (Figura 2)

Figura 2 Produção de cerveja nos mosteiros: cervejas Trapistas



Fonte: Adaptado de (HORNSEY, 2003)

Foi apenas no século XII que o interesse pela indústria cervejeira se desenvolveu além dos mosteiros, com a igreja também cedendo os direitos de

fabricação de cerveja para cervejarias privadas. A partir do século XVI, a cerveja se expandiu por todo o mundo, tornando-se uma bebida global. (BAMFORTH, C.W., 2017)

A globalização da cerveja permitiu que diferentes ingredientes fossem incorporados ao processo de fabricação da bebida, sendo assim não havia uma padronização ou restrição de ingredientes que podiam ser utilizados na produção cervejeira.

Em 23 de abril de 1516, na Baviera foi promulgada uma lei de pureza de cerveja pelo duque Guilherme IV. Esta lei restritiva permitia o uso apenas de água, malte de cevada e lúpulo para fabricação de cerveja. Pouco mais tarde, esta lei foi alterada, as leveduras foram incorporadas a lista de ingredientes, uma vez que foi descoberto seu papel na fermentação da bebida.

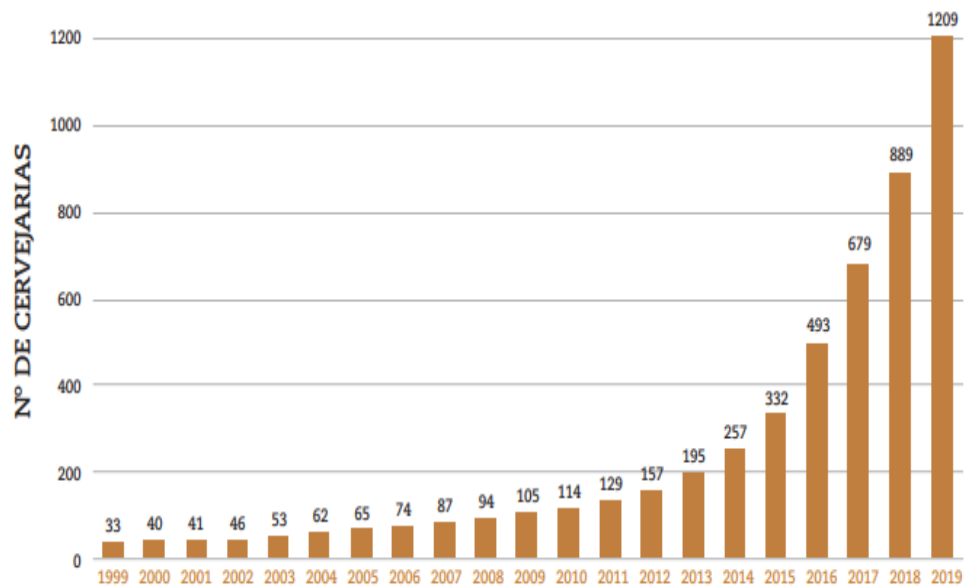
Esta lei é conhecida como Reinheitsgebot, e esta em vigor em muitos países até hoje, e pode ser associada a primeira tentativa de controlar a qualidade de cervejas. (HORNSEY, 2003)

1.3 A CERVEJA NO BRASIL

A cerveja chegou ao Brasil durante o período colonial, trazida pela família real portuguesa. Desde as primeiras garrafas envasadas em solo brasileiro, até hoje, podemos dizer que esta bebida é uma paixão nacional.

Os dados estatísticos mostram como setor industrial cervejeiro tem se comportado nas últimas duas décadas, na Figura 3, é mostrado o número de cervejarias legalmente registradas no Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) durante o período de 1999 a 2019. Pode-se notar um crescimento exponencial, movidos pelo avanço tecnológico no setor e principalmente pela alta demanda de consumidores. O crescimento no número de estabelecimentos se mostra constante nos últimos vinte anos, com uma taxa média de 19,6% de crescimento por ano. Recentemente esta taxa de crescimento cresceu, sendo de 26,6% se analisado o período dos últimos 10 anos. (ANUÁRIO, 2019).

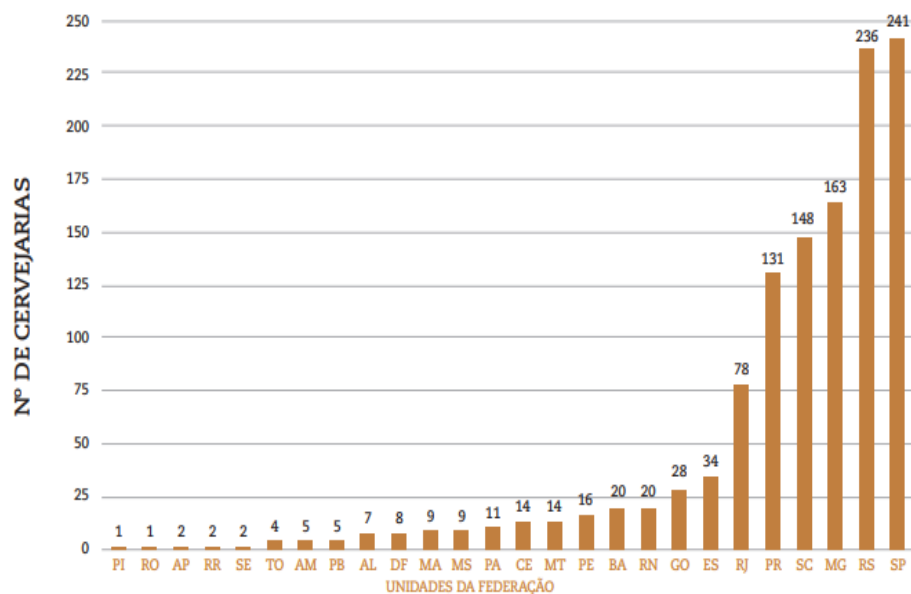
Figura 3- Número de cervejarias legalmente registradas no MAPA



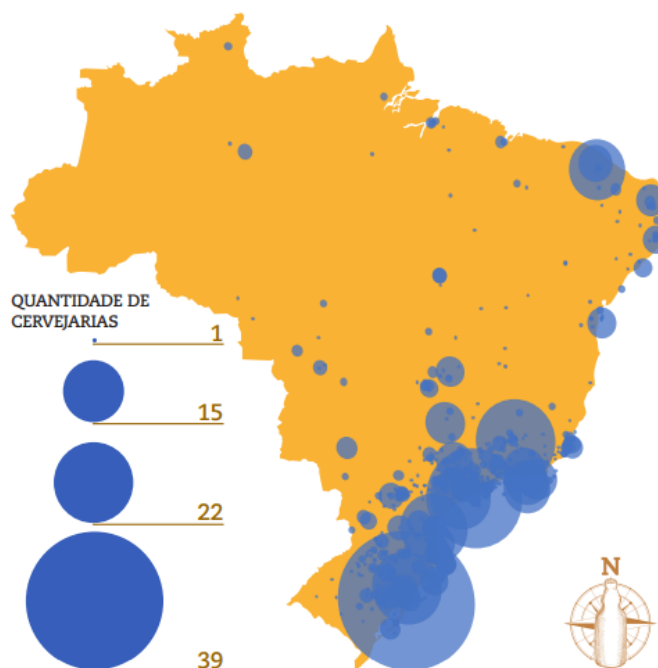
Fonte: Anuário da cerveja 2019

A produção de cerveja no Brasil tem crescido ano a ano. No entanto, este crescimento é centralizado nas regiões Sul e Sudeste do país como mostrado na Figura 4.

Figura 4- Número de cervejarias por estados do Brasil



Fonte: Anuário da cerveja 2019



Fonte: Anuário da cerveja 2019

Apesar da maior concentração de cervejarias nos estados do Sul e Sudeste, alguns estados do nordeste do país, como Rio Grande do Norte, Alagoas e Bahia, apresentam crescimentos notáveis com taxas de 122%, 75% e 68% respectivamente.

Se mantida a taxa de 36% de crescimento até 2025 o país alcançaria a marca de 7504 cervejarias, o que ultrapassa o número de cervejarias dos EUA no último balanço disponível de 2018 com 7.346 cervejarias. O crescimento intermediário chega perto das 5 mil cervejarias e o mais modesto em 3.5 mil (ANUÁRIO, 2019).

1.4 INGREDIENTES CERVEJEIROS

1.4.1 Água

A origem da água usada na fabricação de cerveja é um parâmetro muito importante em diversas etapas do processo de fabricação de cerveja, por exemplo, na fermentação, onde a quantidade e o tipo de sais inorgânicos dissolvidos afetam todas as reações químicas, influenciam o valor do pH do meio e, consequentemente, contribui diretamente a extração de compostos de lúpulo durante a ebulição do mosto.

Um valor mais baixo de pH da água aumenta a atividade de algumas enzimas e um valor mais alto pode contribuir para a extração de compostos polifenólicos indesejáveis dos cereais, afetando assim o sabor e aroma da cerveja. Todas as reações químicas relacionadas à produção de cerveja ocorrem em meio aquoso e a água representa cerca de 90% da composição da cerveja (CONSONNI; BERNAREGGI; CAGLIANI, 2018).

Quadro 1 Descrição da composição química da água cervejeira

Item	Unidade	Água cervejeira
pH	pH	6,5 - 8,0
Turbidez	NTU	Menor que 0,4
Sólidos dissolvidos totais	mg/L	50 – 150
Alumínio	mg/L	< 0,05
Ferro	mg/L	1,0 – 100,0
Sílica	mg/L	1,0 – 15,0
Sulfatos	mg/L	1,0 – 30,0
Alcalinidade	mg/L	0,8 – 25,0
Cloretos	mg/L	1,0 – 20,0
Dureza Total	mg/L	18 – 79
CaO	mg/L	5,0 – 22,0
MgO	mg/L	1,0 – 6,0

Fonte: (BAMFORTH, C.W., 2017)

Alguns dos minerais mais importantes encontrados na água são: HPO_4^- , que permite a produção de adenosina trifosfato (ATP), integra as membranas fosfolipídicas da levedura e atua como um íon tampão, o enxofre, usado no metabolismo de aminoácidos e potássio e sódio, necessários para a ativação da bomba iônica de hidrogênio.

A alcalinidade da água é uma medida da capacidade de tamponamento que é produzida pelos íons bicarbonato, carbonato. É uma característica importante da água da cerveja, uma vez que influencia o controle do pH durante a produção do mosto. Está relacionado com a dureza da água. A alcalinidade pode ser determinada por titulação com ácido clorídrico (JEONG; CHO; KIM, 2017).

O ferro e magnésio são dois íons importantes no metabolismo da respiração e na multiplicação e crescimento celular. O magnésio é uma coenzima importante no

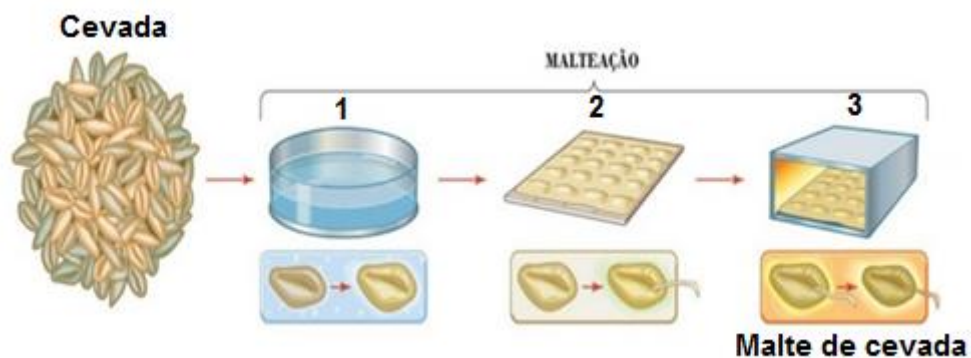
processo de fermentação da levedura e, finalmente, o cálcio é muito útil na fermentação, uma vez que protege a α -amilase da degradação térmica, contribuindo para uma cor de mosto desejável e também ajuda a controlar a floculação da levedura (LI *et al.*, 2016).

1.4.2 Malte

O malte (cevada maltada) tem um papel dominante na fabricação de cerveja tradicional, onde os grãos de cevada são convertidos em malte por meio de germinação controlada, chamada de malteação, de acordo com a Figura 5. O processo de malteação ocorre em três etapas: umidificação, germinação e secagem através de calor (torrefação). (KUNZE; MANGER; PRATT, 2014)

Embora algumas enzimas já estejam presentes na cevada, como a β -amilase, a maioria das enzimas é formada por meio da germinação, como a protease e a α -amilase, e eventualmente todas as enzimas necessárias para a conversão de grãos em mosto estão presentes no malte (COOPER *et al.*, 2016; DONADINI; FUMI; NEWBY-CLARK, 2014; ŠEDO; MÁROVÁ; ZDRÁHAL, 2012).

Figura 5 Processo de malteação: 1- Cevada umidecida, 2- Germinação, 3- Torrefação para inibir germinação



Fonte: Adaptado de (BOKULICH; BAMFORTH, 2013)

Figura 6 Diferentes tipos de maltes e diferentes níveis de torras.



Fonte: Adaptado de (BOGDAN; KORDIALIK-BOGACKA, 2017)

Os maltes de cevada podem ser classificados em lager, malte de fermentação e malte escuro (especial), são mostrados na Figura 6. O principal ingrediente para a produção de cerveja, maltes claros, são ligeiramente aquecidos (70-95 °C). (VAN DONKELAAR *et al.*, 2016)

Os maltes escuros podem ser categorizados em maltes coloridos, maltes caramelo (cristal) e maltes torrados. Os maltes coloridos (tipo Munique) são produzidos em um forno que usa temperaturas de cura elevadas (até 105 ° C), enquanto os maltes caramelo e torrados são obtidos pela torrefação de malte verde e malte Pilsen até 220–250 ° C. (DONADINI; FUMI; NEWBY-CLARK, 2014)

Para maltes caramelo, uma etapa de secagem adicional é incluída no processo antes da torrefação para permitir a hidrólise extensiva de carboidratos e proteínas. (SPEVACEK *et al.*, 2016).

1.4.3 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) pertence à família *Cannabinaceae*, sendo planta de difícil cultivo e típica de regiões frias. A relevância da planta de lúpulo para a indústria cervejeira é atribuída principalmente aos metabólitos secundários presentes nas glândulas de lupulina das inflorescências femininas, (Figura 7).

Figura 7- O lúpulo e a representação da estrutura vegetal de armazenamento de resina de lúpulo



Fonte: (AYABE *et al.*, 2018)

De acordo com suas propriedades físico-químicas, esses metabólitos secundários são frequentemente classificados em três frações: as resinas de lúpulo, o óleo de lúpulo e os polifenóis de lúpulo (FERREIRA *et al.*, 2005; OLADOKUN *et al.*, 2017; STEENACKERS; DE COOMAN; DE VOS, 2015).

As resinas de lúpulo são caracterizadas por sua solubilidade em metanol frio e éter dietílico e são classificadas posteriormente, dependendo de sua solubilidade em hexano. As resinas são solúveis em hexano e contêm principalmente derivados prenilados, como os α -ácidos e β -ácidos do lúpulo (SPRENG; HOFMANN, 2018).

O óleo essencial de lúpulo é, por definição, a fração do lúpulo que pode ser isolada por destilação a vapor. O monoterpene mirceno e os sesquiterpenos, alfa-humuleno e β -cariofileno, constituem a maior parte do óleo essencial, mas os componentes contendo oxigênio e enxofre também estão presentes.

Ao lado das resinas e do óleo de lúpulo, uma mistura complexa de polifenóis, consistindo de ácidos carboxílicos aromáticos e flavonóides não prenilados, incluindo proantocianidinas e glicosídeos de flavonol, está presente nos cones de lúpulo (HEUBERGER *et al.*, 2012).

1.4.4 Levedura

Levedura é o nome genérico dado a um grupo de microrganismos classificados dentro de fungos e definidos como tendo estados vegetativos nos quais a proliferação assexuada ocorre por brotamento ou fissão. Elas crescem predominantemente como células únicas, embora muitas espécies exibam

dimorfismo e tenham fases em seus ciclos de vida em que adotam uma morfologia filamentosa e se desenvolvem em um micélio. Inclui o gênero *Saccharomyces*, no qual reside a levedura responsável por transformar o mosto em cerveja (WHITING, 1976).

Figura 8- Representação ilustrativa da fermentação alcoólica do mosto cervejeiro.



Fonte: Adaptado de (WHITING, 1976)

Na fabricação de cerveja, os termos levedura e *Saccharomyces* são frequentemente, e incorretamente, usados de forma intercambiável. Na verdade, existem aproximadamente 100 gêneros de leveduras que são posteriormente classificados em mais de 700 espécies individuais. Esses números aumentarão à medida que novas espécies forem descobertas. Cada espécie pode ser subdividida em várias linhagens individuais, a última representando a menor unidade com um genótipo distinto. Da mesma forma, do ponto de vista fisiológico, a capacidade de catalisar a fermentação alcoólica é uma propriedade de menos da metade das espécies de leveduras conhecidas (BAMFORTH, C.W., 2017).

Essa diversidade é refletida pelo fato de que as leveduras ocorrem em três das divisões dos fungos: *Ascomycota*, *Basidiomycota* e *Deuteromycota*. Todas as leveduras de cerveja são ascomicetas, um grupo de fungos em que ocorre um estágio sexual no qual os ascósporos resultantes são carregados dentro de um corpo semelhante a um saco chamado asco. Todas as cepas de cerveja são

membros do gênero *Saccharomyces*. O termo vem da palavra latina que significa "fungo do açúcar" (PIRES *et al.*, 2014).

1.4.5 Adjuntos

Os adjuntos são definidos simplesmente como fontes alternativas diferentes do malte. Uma grande variedade de materiais pode ser usada. Eles podem ser empregados unicamente com base no custo ou porque conferem propriedades desejáveis à cerveja que não podem ser alcançadas pelo uso apenas de malte.

Adjuntos geralmente podem ser usados em certas localizações geográficas onde são abundantes e, portanto baratos, por exemplo, o uso de arroz em muitas cervejas norte-americanas. Em países sujeitos às restrições da lei de pureza alemã *Reinheitsgebot*, o uso de adjuntos é proibido. Em alguns países, o uso de adjuntos oferece vantagens fiscais. (DICAPRIO; EDWARDS, 2014)

Os adjuntos são normalmente derivados de vários cereais. Estes podem ser cereais crus relativamente não processados ou extratos purificados. Os adjuntos podem ser líquidos ou sólidos. No caso dos tipos líquidos, eles assumem a forma de vários xaropes de açúcar derivados do milho, trigo, arroz, cevada não-malteada e cana de açúcar. (BOGDAN; KORDIALIK-BOGACKA, 2017; COOPER *et al.*, 2016; GLATTHAR; HEINISCH; SENN, 2005).

Normalmente, estes podem ser adicionados ao mosto durante a fase de ebulição e, por esta razão, são frequentemente referidos como adjuntos de caldeira. A razão para a adição nesta fase é uma conveniência, uma vez que ignora as fases de preparação do mosto de manipulação de sólidos e o tratamento térmico garante a esterilidade.

Todos os adjuntos devem ser usados com muito cuidado. Muitos conferem propriedades desejáveis, como boa retenção de espuma em cervejas (farinha de trigo) ou sabores neutros limpos (arroz). Por outro lado, alguns podem estar associados a problemas de turvação devido a altos níveis de β -glucanos (cevada não-malteada). (ZHUANG *et al.*, 2017)

As fontes relativamente puras de amido ou açúcares refinados são boas fontes de extrato fermentável, mas tendem a ter baixos teores de nitrogênio, de modo que o uso indevido pode levar a efeitos concomitantes no crescimento de levedura e na formação de compostos químicos que conferem a bebida efeitos indesejáveis e desagradáveis ao paladar e o olfato. (POREDA *et al.*, 2014).

1.5 ETAPAS DO PROCESSO DE FABRICAÇÃO DE CERVEJA

1.5.1 Mosturação

A solução açucarada resultante da hidrólise do amido é chamada de mosto. O mosto deve ser separado dos componentes insolúveis. O procedimento usual, denominado filtração, é usar a camada de grãos como meio de filtragem. Um procedimento mais recente de filtração do mosto consiste em conduzir o mosto através de filtros de polímero. (NOBIS *et al.*, 2019)

O mosto é solução aquosa que é formada por meio dos processos sequenciais de preparação de grãos, separação de grãos, fervura, clarificação e resfriamento. A origem da palavra é obscura, mas pode derivar do inglês antigo *wyrt*, que carrega a implicação de ser um extrato de origem vegetal. O mosto é submetido a um tratamento térmico controlado na etapa final de produção, imediatamente antes da clarificação e resfriamento. (HOLMES; CASEY; COOK, 2017)

A α -amilase (α -1,4-glucano 4-glucano-hidrolase) é uma enzima que hidrolisa ligações $\alpha(1,4)$ em polipeptídeos de amido. É um componente da diástase do malte, que, em conjunto com outras enzimas hidrolíticas, β -amilase, dextrinase limite, α -glucosidase e fosforilase, são responsáveis pela degradação do amido e a subsequente liberação de açúcares fermentáveis durante a fase de mosturação. (VAN DONKELAAR *et al.*, 2016)

Dependendo de onde as cadeias de glucana são clivadas, uma variedade de produtos pode ser formada. Estes incluem glicose, maltose e uma variedade de oligossacarídeos ramificados e não ramificados e dextrinas. (PETERSEN; MEIER; DUUS, 2012)

A filtragem do mosto permite que o grão seja moído mais fino, proporcionando uma maior conversão de amido durante a mosturação. Durante a separação do mosto, o leito de grãos é enxaguado com água quente adicional para extrair o máximo de açúcar possível. O mosto é fervido em uma caldeira, geralmente com o calor fornecido pelo vapor. O lúpulo é adicionado para fornecer amargor e aroma. (LODOLO *et al.*, 2008)

Os compostos amargos do lúpulo são produzidos durante a ebulição por isomerização lenta dos componentes do lúpulo. (AYABE *et al.*, 2018; DE ALMEIDA, N. E. C.; DO NASCIMENTO; CARDOSO, 2012)

Esses compostos possuem funcionalidades cetona, álcool e alceno. O principal composto amargo do lúpulo é a isohumulona. Os componentes isomerizados do lúpulo podem sofrer uma reação fotoquímica resultante, após uma série de reações de radicais livres. (BLANCO; NIMUBONA; CABALLERO, 2014)

Alguns cervejeiros usam produtos de lúpulo extraídos das flores com dióxido de carbono supercrítico em vez de lúpulo inteiro. Esses produtos de lúpulo podem ser parcialmente hidrogenados para eliminar a suscetibilidade à luz, o que é conveniente se a cerveja for embalada em garrafas transparentes.

A fervura remove os compostos de sabor voláteis, alguns dos quais dariam sabor à cerveja. A fervura também causa a coagulação das proteínas do grão e a precipitação dos lipídios. O material sólido é removido após a fervura, dando uma cerveja mais límpida e menos sujeita a deterioração. A fervura é o processo de fermentação que usa mais energia. Após a fervura, o mosto é resfriado em um trocador de calor. (HASELEU; INTELMAH; HOFMANN, 2009)

1.5.2 Fermentação

A fermentação é o termo usado para descrever o estágio da fermentação em que o mosto é convertido em cerveja. O processo é catalisado pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, geralmente uma cultura pura de uma cepa selecionada, ocasionalmente uma mistura de duas ou mais cepas de levedura e mais raramente uma mistura relativamente não caracterizada de levedura e bactérias. O termo "fermentação" deriva do latim *fevere* que significa "ferver", uma referência à natureza efervescente visível do processo devido à formação de CO₂ gasoso. (BAMFORTH, C.W., 2017; PIRES *et al.*, 2014).

Deve ser apreciado que a fermentação da cerveja é a manifestação do crescimento do fermento. Nesse sentido, a cerveja é simplesmente o meio de crescimento gasto que permanece após o término do crescimento do fermento. A fermentação serve para regular o crescimento e o metabolismo da levedura de forma que a cerveja tenha a composição desejada. (BOKULICH; BAMFORTH, 2013)

Durante a fermentação, a levedura cresce com os nutrientes disponíveis no mosto, normalmente multiplicando-se entre quatro e seis vezes. Como resultado desse crescimento, os açúcares que as células de levedura são capazes de assimilar são convertidos em grande parte em etanol e CO₂. As reações são descrito

pela equação de Gay-Lussac Eq. (1), que indica que para cada molécula de glicose fermentada, duas moléculas de etanol e CO₂ são formadas. (BOULTON, 2013)



1.5.3 Maturação

Na produção de cerveja tradicional, as fermentações secundárias são realizadas em embalagem grande (cerveja em barril) ou em embalagem pequena (acondicionamento em garrafa). Em sua forma mais simples, a cerveja é removida da fermentação primária após o resfriamento, colhendo o fermento e quando o extrato fermentável residual e a contagem de fermento são considerados apropriados. Nesta fase, a cerveja pode ser simplesmente transferida para um barril ou garrafa onde ocorre a fermentação secundária. (GEISSLER *et al.*, 2016; SPEVACEK *et al.*, 2016)

Este último é principalmente para gerar CO₂, mas também ocorrem algumas mudanças no sabor que resultam da liberação de metabólitos de levedura, especialmente no caso de cervejas condicionadas em garrafa, onde a vida útil é relativamente longa. Embora esse processo seja simples, é difícil de controlar e, por esta razão, um tanque intermediário, denominado tanque de armazenamento, é usado como armazenamento temporário entre o fermentador e a embalagem final. (COOTE; KIRSOP, 1974).

A maturação corresponde ao período de estacionamento da cerveja, a temperatura adequada, com o objetivo de permitir a libertação dos componentes voláteis indesejáveis às características finais da bebida. Durante este tempo, quantidades relativamente pequenas de levedura permanecem em contato com a cerveja, para produzirem mais dióxido de carbono, que permite a carbonatação da cerveja e a purga dos compostos voláteis indesejáveis.

1.6 TIPOS E ESTILOS DE CERVEJA

As cervejas podem ser classificadas de diferentes formas, por tipo e estilo. O tipo de cerveja é definido pelo processo de fermentação pelo qual a bebida é obtida, e o estilo está relacionado com os ingredientes utilizados na fabricação da cerveja. (CAVALLINI *et al.*, 2019).

Na Figura 9, pode-se ver a ilustração do processo de fermentação dos dois tipos de cervejas mais comuns e também a descrição de algumas características físicas e organolépticas que permitem diferenciá-las.

Figura 9- Ilustração dos dois tipos mais comuns de fermentação de cerveja: ale e lager



Fonte: Autor

1.6.1 Ale

Ale é o termo usado para descrever uma classe específica de cerveja. A palavra aparentemente deriva da Escandinávia como no nórdico, oel ou aul.

Atualmente, o termo ale se refere a cervejas produzidas por uma fermentação caracterizada pelo uso de uma cepa de levedura que durante a fase de crescimento se separa da cerveja subindo à superfície. Consequentemente, tais cepas de ale são referidas como sendo de alta fermentação.

As cervejas são descritas como sendo produzidas por meio de fermentação superior e os tanques de fermentação são projetados para acomodar a formação e coleta de uma safra superior. (BAMFORTH, CHARLES W, 2002)

1.6.2 Lager

O termo lager passou a se referir a um tipo particular de cerveja que se distingue das ales, pois os mostos são comumente produzidos por maceração, por de cocção e por fermentação inferior (temperaturas mais baixas).

A última terminologia se refere ao uso de uma cepa de levedura lager que, entre outras características, é aquela que se deposita no fundo do tanque durante e após a conclusão da fermentação. Além disso, na fase final de produção, as cervejas lager tradicionais são submetidas a um longo período de armazenamento em temperaturas amenas, durante o qual ocorre a maturação do sabor e clarificação. (BAMFORTH, C.W., 2017)

É esta fase de armazenamento que dá nome ao tipo de cerveja. Muitos tipos diferentes de cerveja são produzidos usando esse processo básico e todas podem ser chamadas de lagers. A variedade é enorme e abrangem todas as cores, desde o muito pálido ao muito escuro, e uma variedade igualmente grande de sabores. Cada estilo é referido usando um nome de cerveja específico. Os exemplos incluem bock, dunkel, Helles, Marzen e pilsener.

O desenvolvimento de maltes Pilsener Pilsen e a popularidade das cervejas feitas com eles fizeram com que esse tipo de cerveja se tornasse a cerveja mais produzida e consumida em todo o mundo. (A. BLANCO *et al.*, 2014)

1.7 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A maioria das aplicações de espectroscopia de RMN em alimentos e bebidas está relacionada à autenticação, embora a sua utilização de nesta área seja relativamente nova. Validar a autenticidade dos produtos alimentares e estabelecer um ambiente de mercado justo é de suma importância, devido às suas significativas consequências econômicas e de saúde, e assim atrai o interesse de produtores, consumidores e órgãos responsáveis pela fiscalização. (GRANATO *et al.*, 2018; LACHENMEIER *et al.*, 2005; SÁNCHEZ-ESTÉBANEZ *et al.*, 2018)

1.7.1 Aspectos gerais

A ressonância magnética nuclear ou RMN consiste em um método espectroscópico comumente empregado para realizar a determinação estrutural a partir principalmente dos hidrogênios e carbonos presentes em um dado composto.

O emprego da ressonância magnética nuclear teve início na década de 1940. Posteriormente na década de 1950 houve o emprego de δ e J como ferramentas de determinação estrutural. Na década de 1960 houve a introdução da RMN de transformada de Fourier e o uso do efeito nuclear Overhauser (NOE) para determinação estrutural. (HATZAKIS, 2019)

Sequencialmente na década de 1970 ocorreu o emprego de ímãs supercondutores; controle total do equipamento pelo computador. A partir de 1980 foi realizada a introdução de pulsos múltiplos e espectroscopia em 2-D e na década de 1990 a RMN foi acoplada a outras técnicas (BREITMAEIR, 1993). Dessa forma, todo esse breve contexto histórico relacionado à ressonância magnética nuclear se encontra resumido no Quadro 2 a seguir.

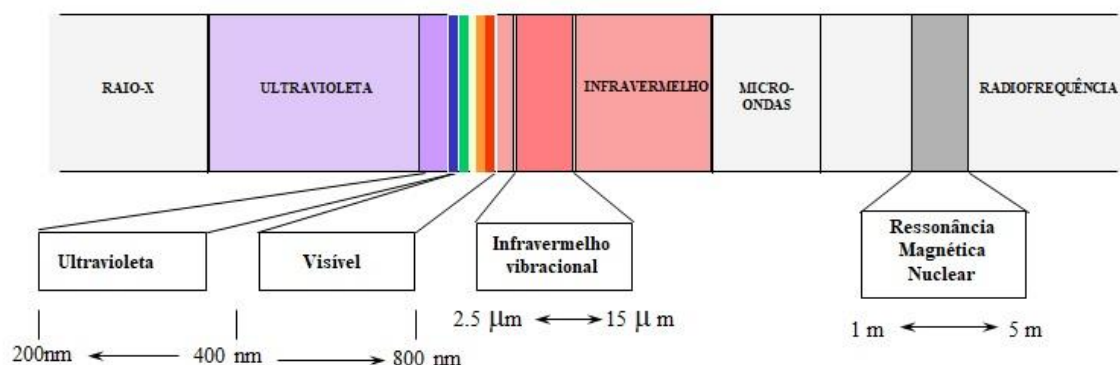
Quadro 2 Histórico da evolução da ressonância magnética nuclear.

Década	Descoberta/ Avanço RMN
1940s	Primeira observação de RMN em sólidos e líquidos (1945).
1950s	Uso dos δ e J como ferramentas de determinação estrutural.
1960s	Introdução da RMN de FT; uso do efeito NOE para determinação estrutural.
1970s	Emprego de ímãs supercondutores; controle total do equipamento pelo computador.
1980s	Introdução de pulsos múltiplos, e espectroscopia em 2-D.
1990s	Acoplamento da RMN com outras técnicas.

Fonte: Adaptado de Silverstein et al., 2000.

No espectro eletromagnético é possível verificar que a ressonância magnética nuclear se enquadra na região da radiofrequência e os principais processos relacionados a isso consistem nas alterações no campo magnético dos núcleos, sendo esses aspectos evidenciados na Figura 10.

Figura 10 - Espectro eletromagnético e RMN



Fonte: Adaptado de Silverstein et al., 2000.

O princípio da ressonância magnética nuclear (RMN) se baseia no fato de alguns núcleos exibirem momento magnético e se assemelham a “pequenos” ímãs. Neste contexto, diferentes núcleos atômicos apresentam uma propriedade denominada de spin e nesse caso os núcleos se comportam como se estivessem girando.

A questão é que qualquer núcleo atômico que possua número de massa ímpar, número atômico ímpar ou ambos tem um momento angular de rotação quantizado e um momento magnético. Dessa forma, os núcleos mais comuns que possuem spin incluem ^1H , ^2H , ^{13}C , ^{14}N , ^{17}O e ^{19}F .

É válido mencionar mediante ao que foi exposto anteriormente que os núcleos dos isótopos considerados mais abundantes de carbono e oxigênio, os quais são respectivamente ^{12}C e ^{16}O , não se encontram incluídos entre aqueles com a propriedade de spin. Contudo, o núcleo do átomo de hidrogênio comum, o prótio, tem spin.

Dessa forma, o que foi discutido anteriormente em relação ao spin nuclear se encontra resumido na Tabela 1 e na mesma é possível observar que serão ativos no RMN apenas núcleos que possuem o valor de I que seja diferente de zero.

Tabela 1 Relação entre spin nuclear (I) e núcleos ativos no RMN

I	Número atômico (Z)	Exemplo
Fracionário	Par ou ímpar	$^1\text{H}(1/2)$, $^{17}\text{O}(5/2)$, $^{15}\text{N}(1/2)$
Inteiro	Ímpar	$^2\text{H}(1)$, $^{14}\text{N}(1)$, $^{10}\text{B}(3)$
Zero	Par	$^{12}\text{C}(0)$, $^{16}\text{O}(0)$, $^{34}\text{S}(0)$

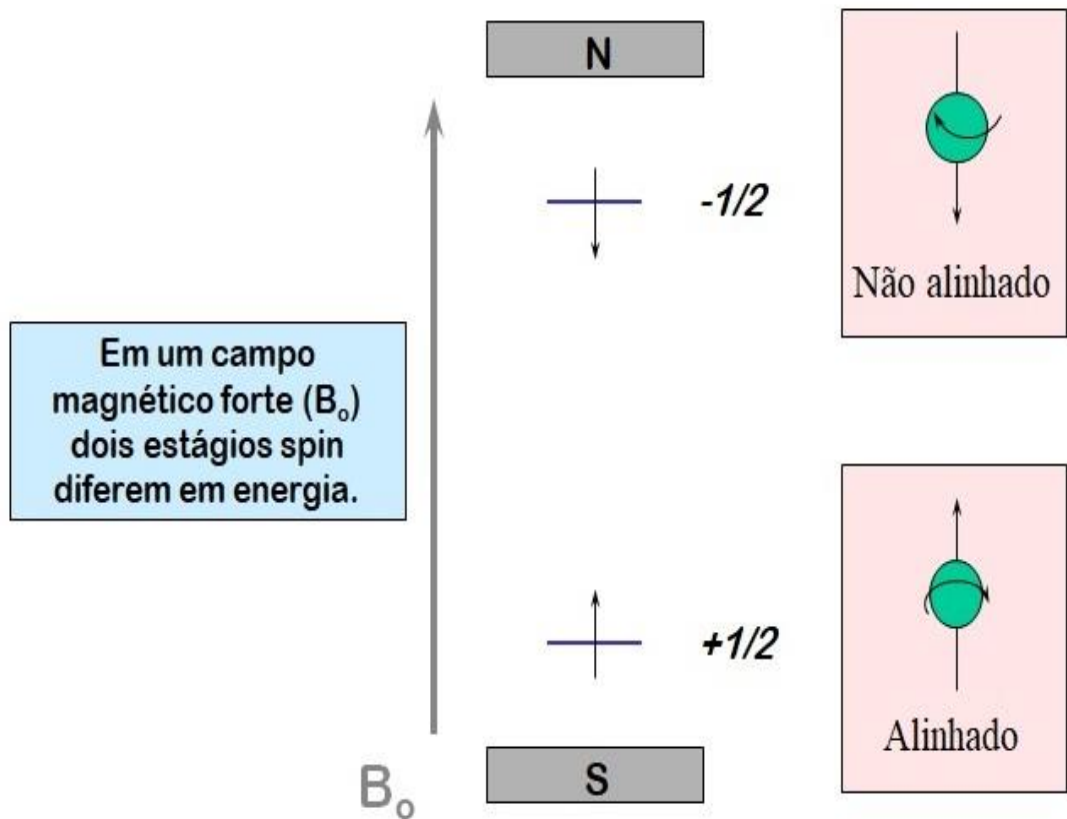
Fonte: Adaptado de Silverstein et al., 2000.

Os estados de spin não possuem energia equivalente em um campo magnético aplicado, visto que, o núcleo é uma partícula carregada e qualquer carga em movimento gera um campo magnético próprio. Logo, o núcleo em questão possui um momento magnético gerado por sua carga e spin e com isso um núcleo de hidrogênio pode ter um spin no sentido horário (+1/2) ou anti-horário (-1/2), e os momentos magnéticos nucleares (m) nos dois casos são apontados em direções opostas.

Neste contexto, um campo magnético aplicado faz com que os prótons apresentem seus momentos magnéticos alinhados com o campo ou opostos ao mesmo. Dessa forma, os núcleos de hidrogênio podem adotar apenas uma ou outra dessas orientações no que se refere ao campo aplicado.

O estado de spin +1/2 é de menor energia já o estado de spin -1/2 é de maior energia devido ao fato de se opor ao campo aplicado. Assim, essa questão se encontra evidenciada na Figura 11.

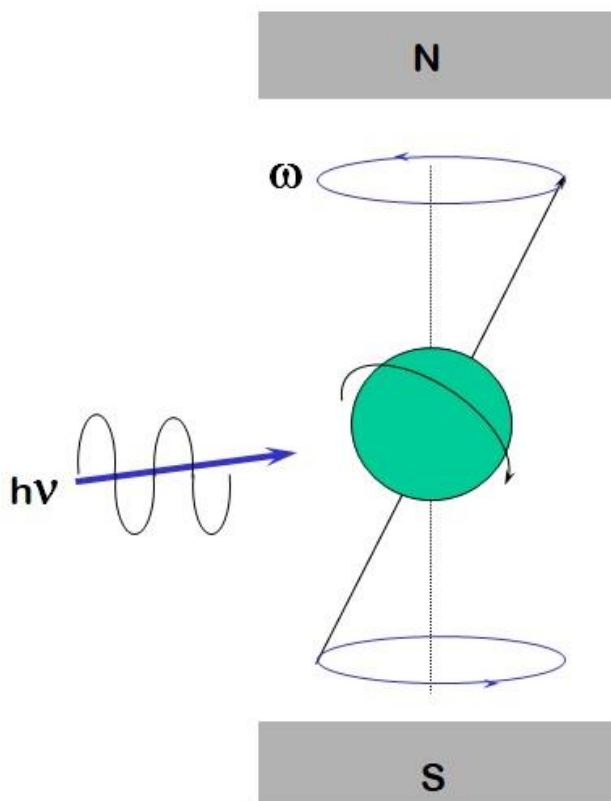
Figura 11 - Níveis de energia nuclear de spin



Fonte: Adaptado de Silverstein et al., 2000.

Os prótons absorvem energia, pois os mesmos começam o movimento de precessão em um campo magnético aplicado. Dessa forma, o núcleo consiste em um fenômeno é semelhante ao de um pião, ou seja, devido à influência do campo gravitacional da Terra, ocorre o início da oscilação do topo em torno de seu eixo. Logo, um núcleo giratório se comporta de maneira semelhante quando sofre a influência de um campo magnético aplicado, conforme mostrado na Figura 12.

Figura 12 – Precessão do núcleo devido à influência de um campo magnético



Fonte: Adaptado de Silverstein et al., 2000.

Em termos de equipamento pode-se inferir que o espectrômetro com transformada de Fourier (TF) permite que todos os núcleos sejam analisados simultaneamente.

Neste contexto, esse tipo de equipamento faz uso de pulso, o qual promove a excitação de todos os núcleos magnéticos da molécula simultaneamente. Logo, ao empregá-lo para analisar qualquer molécula orgânica ocorrerá que todos os núcleos de ^1H serão induzidos a sofrer ressonância ao mesmo tempo. Assim, os resultados obtidos com esses experimentos para a determinação estrutural de uma dada molécula.

A análise dos resultados obtidos deve considerar alguns pontos importantes como a questão da equivalência química, pois a mesma apresenta correlação com o deslocamento químico observado em um dado espectro de RMN. O fato é que os prótons encontrados em ambientes quimicamente idênticos dentro de uma molécula são considerados quimicamente equivalentes e conseqüentemente exibem o mesmo

deslocamento químico. Dessa forma, os prótons presentes na molécula de tetrametilsilano (TMS) devido ao fato de serem considerados equivalentes por questão de simetria possuem ressonância em um único valor, ou seja, esse composto dará origem a um único pico de absorção em seu espectro de RMN devido ao fato desses prótons serem considerados quimicamente equivalentes. Em contrapartida, no caso de uma molécula que contenha prótons considerados quimicamente distintos, poderá ser observado um pico de absorção diferente para cada conjunto de prótons. Consequentemente, nesse caso os conjuntos de prótons são considerados quimicamente não equivalentes.

O fato é que se as frequências de ressonância de todos os conjuntos de prótons de uma dada molécula fossem as mesmas, o experimento de RMN não seria considerado de grande utilidade no que se refere à determinação estrutural de muitos compostos.

Dessa forma, o valor numérico em unidades de ppm para o deslocamento químico de um prótio fornece uma indicação a respeito do tipo de prótio que origina o sinal em questão. Em termos práticos, os prótios aromáticos da fenilacetona e do acetato de benzila apresentam ressonância próximo de 7,3 ppm e que ambos os grupos metila ligados diretamente a uma carbonila possuem ressonância em cerca de 2,1 ppm.

Assim, os prótios aromáticos possuem ressonância próxima de 7 a 8 ppm, já os grupos acetila como grupos metila mencionados anteriormente possuem ressonância próxima de 2 ppm.

Esse tipo de análise pode ser empregado para todos os prótios a fim de facilitar a análise do espectro de RMN em um processo de determinação estrutural.

Na Tabela 2 se encontra evidenciados os deslocamentos químicos típicos para cada tipo de prótio.

Tabela 2 - Deslocamentos químicos típicos para cada tipo de prótio.

$R-CH_3$		0.7 – 1.3	$R-\overset{ }{\underset{ }{N}}-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$	2.2 – 2.9
$R-CH_2-R$		1.2 – 1.4	$R-\overset{ }{\underset{ }{S}}-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$	2.0 – 3.0
R_3CH		1.4 – 1.7		
$R-\overset{ }{\underset{ }{C}}=\overset{ }{\underset{ }{C}}-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$		1.6 – 2.6	$I-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$	2.0 – 4.0
$R-\overset{\overset{O}{ }}{\underset{ }{C}}-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H, H-\overset{\overset{O}{ }}{\underset{ }{C}}-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$		2.1 – 2.4	$Br-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$	2.7 – 4.1
$RO-\overset{\overset{O}{ }}{\underset{ }{C}}-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H, HO-\overset{\overset{O}{ }}{\underset{ }{C}}-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$		2.1 – 2.5	$Cl-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$	3.1 – 4.1
$N\equiv C-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$		2.1 – 3.0	$R-\overset{\overset{O}{ }}{\underset{\underset{O}{ }}{\underset{ }{S}}}-O-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$	ca. 3.0
		2.3 – 2.7	$RO-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H, HO-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$	3.2 – 3.8
$R-C\equiv C-H$		1.7 – 2.7	$R-\overset{\overset{O}{ }}{\underset{ }{C}}-O-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$	3.5 – 4.8
$R-S-H$	var	1.0 – 4.0 ^b	$O_2N-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$	4.1 – 4.3
$R-\overset{ }{\underset{ }{N}}-H$	var	0.5 – 4.0 ^b	$F-\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$	4.2 – 4.8
$R-O-H$	var	0.5 – 5.0 ^b		
	var	4.0 – 7.0 ^b	$R-\overset{ }{\underset{ }{C}}=\overset{ }{\underset{ }{C}}-H$	4.5 – 6.5
	var	3.0 – 5.0 ^b		6.5 – 8.0
$R-\overset{\overset{O}{ }}{\underset{ }{C}}-\overset{ }{\underset{ }{N}}-H$	var	5.0 – 9.0 ^b	$R-\overset{\overset{O}{ }}{\underset{ }{C}}-H$	9.0 – 10.0
			$R-\overset{\overset{O}{ }}{\underset{ }{C}}-OH$	11.0 – 12.0

Fonte: Pavia et al., 2010.

Alterações químicas podem ocorrer quando se tem elementos eletronegativos substituídos no mesmo carbono ao qual desses prótios de interesse se encontram ligados. Dessa forma, a Tabela 3 mostra essa relação para vários compostos do tipo CH_3X , sendo que para substituintes múltiplos têm um efeito mais forte do que um único substituinte.

Tabela 3- Relação entre eletronegatividade (EN) do substituinte (X) e deslocamento químico (δ).

CH_3X	EN (X)	δ (ppm)
CH_3F	4,0	4,26
CH_3OH	3,4	3,40
CH_3Cl	3,2	3,05
CH_3Br	3,0	2,68
CH_3I	2,7	2.16
CH_3H	2,2	0,23

Fonte: Próprio autor, 2021.

A influência do substituinte diminui rapidamente com a distância, ou seja, o elemento eletronegativo exerce um efeito menor sobre os prótons que se encontram a mais de três carbonos de distância, conforme indicado na Tabela 4 a seguir.

Tabela 4 – Efeito do substituinte eletronegativo e a distância

Distância	δ (ppm)
$-\text{CH}_2\text{Br}$	3.30
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{Br}$	1.69
$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{Br}$	1.25

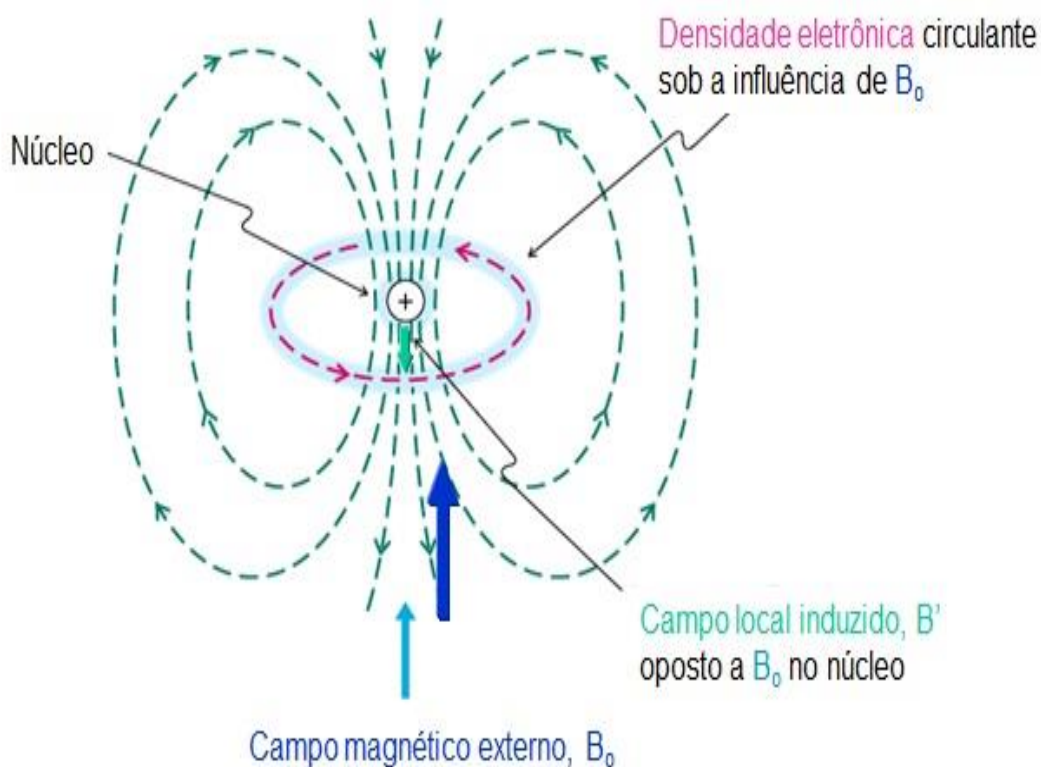
Fonte: Próprio autor, 2021.

Os substituintes eletronegativos ao se encontrarem ligados a um átomo de carbono devido a sua eletronegatividade podem promover o deslocamento de densidade eletrônica e com isso há uma redução da densidade de elétrons de valência em torno dos prótons ligados a esse carbono.

O fato é que esses elétrons protegem o prótio do campo magnético aplicado, sendo esse efeito denominado de blindagem diamagnética local. Dessa forma, os substituintes eletronegativos no carbono reduzem a blindagem diamagnética local na vizinhança dos prótios fixos porque reduzem a densidade de elétrons em torno desses prótios.

Na Figura 13 se encontra evidenciada a blindagem nuclear mencionada anteriormente no texto.

Figura 13 – Blindagem nuclear



Fonte: Adaptado de Pavia et al., 2010.

A hibridização do átomo ao qual o hidrogênio se encontra ligado também pode gerar um efeito em relação ao deslocamento químico. Neste contexto, os hidrogênios ligados a um átomo de carbono sp^3 apresenta deslocamento químico na faixa de 0 a 2 ppm. Já os hidrogênios ligados ao carbono sp^2 exibem um

deslocamento químico maior, sendo o mesmo na faixa de 4,5 a 7 ppm. Contudo, diferente do que poderia se esperar os hidrogênios ligados a um átomo de carbono sp, visto que, os mesmos apresentam deslocamento químico na faixa de 2 a 3 ppm devido ao fato da anisotropia.

1.8 QUIMIOMETRIA

A origem da quimiometria iniciou-se no início da década de 1960, quando a computação científica se tornou geralmente acessível. Os pioneiros utilizavam grandes conjuntos numéricos, geralmente programando em FORTRAN (tipo de linguagem computacional), inserindo e armazenando programas usando cartões perfurados e fita de papel, com uma saída de impressora de linha.

Durante essa era, os computadores não eram vistos como ferramentas essenciais, mas como grandes máquinas de cálculo para programadores especializados. Os primeiros computadores modernos programáveis reconhecíveis e utilizáveis tiveram suas origens na década de 1940, estimulados pelo esforço de guerra, especialmente a quebra de código.

A bioinformática e a quimiinformática tiveram suas origens também nesta época. Muitos projetos médicos envolvem algum perfil genético e, portanto, a necessidade de mineração de dados e bioinformática. Ela difere da quimiometria, pois envolve a mineração de banco de dados e a representação estrutural, que são uma grande área com enormes bancos de dados comerciais de compostos e suas propriedades. (BRERETON, 2014)

Existe alguma relação entre o desenvolvimento da quimiinformática e da bioinformática. Ambas as disciplinas foram catalisadas nas décadas de 1980 e 1990, quando grandes quantidades de informações genéticas e químicas começaram a se tornar publicamente disponíveis. (BRERETON, 2015)

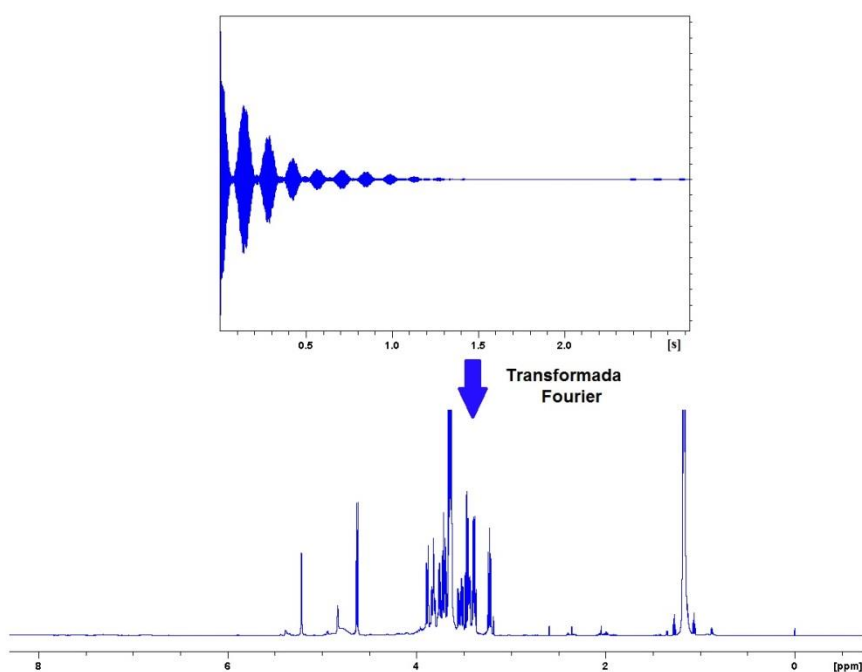
A quimiometria é uma ferramenta estatística valiosa que permite analisar um grande número de variáveis em uma única amostra. Desta forma, a quimiometria é uma ferramenta de interface entre a Química e outras áreas como a Matemática e a Estatística.

1.9 PROCESSAMENTO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^1H

O processamento dos espectros de RMN de ^1H inicia-se com a aquisição do sinal de decaimento livre de indução no domínio do tempo chamado de tempo (Free

Induction Decay, FID), em seguida esse sinal é transformado para domínio de frequência por meio de uma transformação matemática conhecida como Transformada de Fourier como pode ser vista na Figura 14. Logo após, os espectros são submetidos as correções da linha de base e ajuste de fase utilizando os programas TopSpin 4.0.7 (Bruker Biospin, Alemanha) e MestReNova 9.0 (Mestrelab, Espanha). Os espectros devidamente processados são exportados em arquivos em formato ASCII. (DA SILVA; FLUMIGNAN; PEZZA; *et al.*, 2019; DA SILVA; FLUMIGNAN; TININIS; *et al.*, 2019)

Figura 14- Representação da transformação do FID de domínio do tempo para domínio de frequência.



Fonte: Autor

1.10 MÉTODOS QUIMIOMETRICOS

Procedimentos quimiometricos para classificação das amostras de cervejas lager utilizado foram baseados em métodos não supervisionados e supervisionados. Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis, PCA) foi uma abordagem preliminar, utilizada como uma ferramenta exploratória para visualizar o conjunto de dados, concomitantemente a extração de informações relevantes,

identificando quais variáveis são responsáveis pela distinção entre as amostras avaliadas.

Este é um método não supervisionado, porque nenhuma informação anterior sobre as classes de amostra é necessária. Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (Partial Least Square Discriminant Analysis, PLS-DA) e modelagem independente e flexível por analogia de classe (Soft Independent Modeling Class Analogies, SIMCA) foram usados como classificação discriminatória e técnicas de modelagem de classes. (OLIVIERI, 2018; POMERANTSEV; RODIONOVA, 2018). Todas as análises foram realizadas usando o pacote de software Pirouette v. 4.5 (rev. 1) (Infometrix, Bothel, WA, EUA).

1.10.1 Análise de Componentes Principais (Principal Component Analysis, PCA)

A Análise de Componentes Principais (PCA) como método de estatística multivariada foi criada antes da Segunda Guerra Mundial. No entanto, a aplicação mais ampla desse método só ocorreu na década de 1960, durante a "Revolução Quantitativa" nas Ciências Naturais e Sociais. (LID; PLANNING, 1993)

A PCA é um método não supervisionado de classificação, ou seja, apenas a natureza dos dados instrumentais será utilizada para se obter informações sobre o seu comportamento. Por esse motivo, ela também pode ser categorizada como uma análise exploratória dos dados. A aplicação desse método permite descobrir e interpretar mais facilmente os padrões existentes nos dados, além de possibilitar a detecção de amostras com comportamento atípico.

PCA fornece uma aproximação de uma matriz de dados, $\mathbf{X}$, em termos do produto de duas matrizes menores, $\mathbf{T}$ e $\mathbf{P}$. Essas matrizes, $\mathbf{T}$ (scores) e $\mathbf{P}$ (loadings), extraem as informações essenciais de $\mathbf{X}$, para que sua dimensionalidade seja diminuída. É uma ferramenta estatística bastante utilizada para análise exploratória de dados.

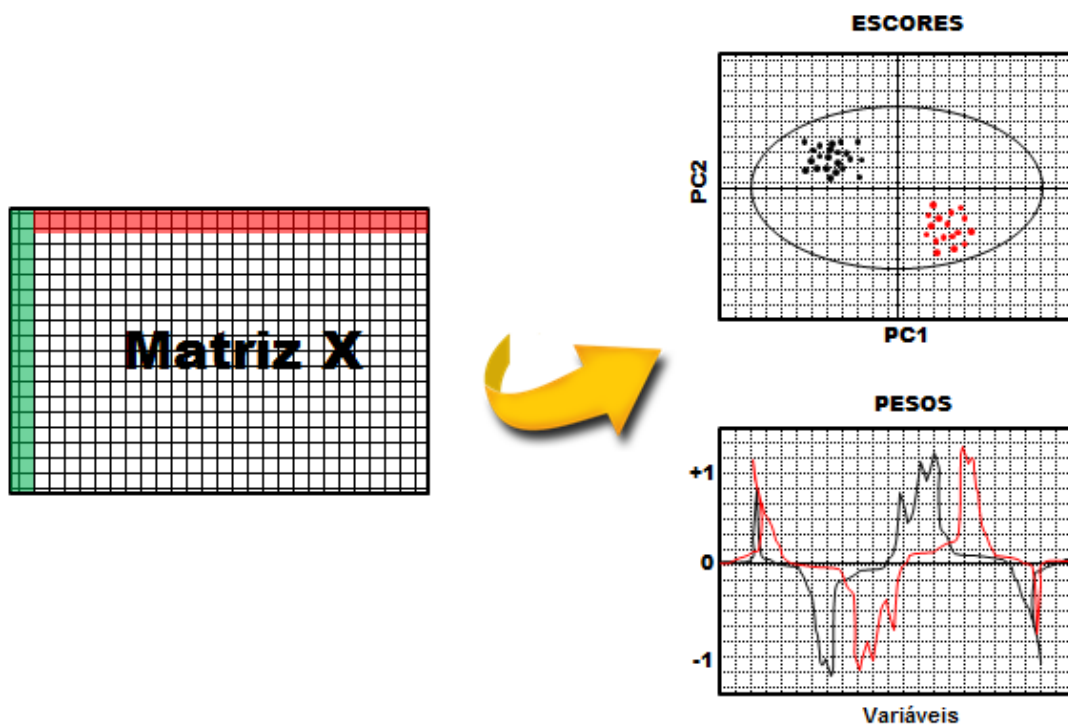
Tem a capacidade de reduzir a dimensionalidade dos dados, encontrando combinações lineares das variáveis independentes originais que representam as quantidades máximas de variação no espaço multidimensional. Cada variável pode ser considerada como uma dimensão diferente (WOLD; ESBENSEN; GELATDI, 1987).

A PCA altera a matriz de dados original, X , para um produto de duas matrizes menores, como mostrado na Eq. 1:

$$X = T P^T + E \quad (1)$$

onde T corresponde aos escores (scores), P são os pesos (loadings) e E é uma matriz de erro. Os espectros de RMN de ^1H da amostra de cerveja foram organizados em uma matriz X na Figura 15, onde as linhas e colunas corresponderam às amostras e aos deslocamentos químicos do RMN de ^1H , respectivamente.

Figura 15- Representação ilustrativa da análise de componentes principais (PCA)



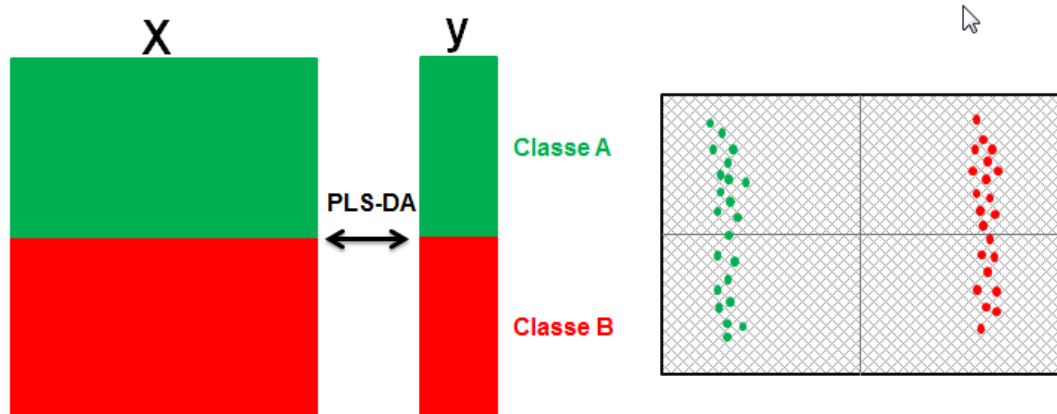
Fonte: Autor

1.10.2 Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (Partial Least Square Discriminant Analysis, PLS-DA).

No modelo análise discriminante por mínimos quadrados parciais, a matriz de dados X pode ser correlacionada com um vetor y , de modo que cada classe pode ser discriminada em relação às outras em modelos diferentes. Geralmente o vetor y é construído por valor discretos que representam as classes categóricas, os valores mais comuns são 0 e 1, os valores codificados que indicam as classes das amostras são decompostos simultaneamente em variáveis latentes (OLIVIERI, 2018). Então, essas variáveis latentes permitem determinar um novo hiperespaço, também chamado de hipercaixas, onde estão contidas informações originais sobre as amostras analisadas, capacitando a discriminação das amostras em diferentes classes categóricas.

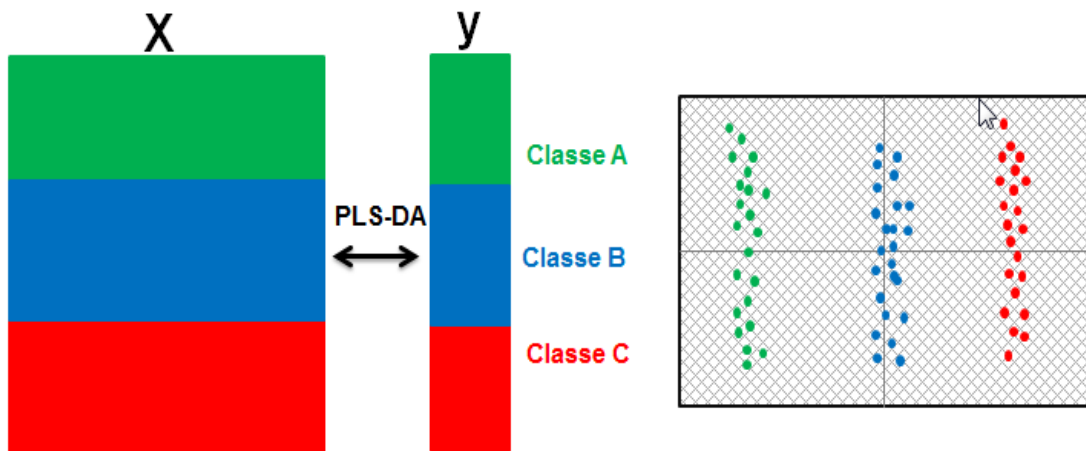
O método PLS-DA possui duas formas variantes: binário e multiclasse. No método PLS1-DA (Figura 16), há uma única possibilidade de atribuição de classe, contido ou não contido em uma classe categórica, e as informações estão codificadas em valores binários (1 ou 0) preenchidos no vetor y . Enquanto o método PLS2-DA (Figura 17) permite a discriminação de três ou mais classes simultaneamente (POMERANTSEV; RODIONOVA, 2018).

Figura 16- Representação do modelo de PLS1-DA



Fonte: Adaptação de (BRERETON, 2015)

Figura 17- Representação do modelo de PLS2-DA



Fonte: Adaptação de (BRERETON, 2015)

1.10.3 Modelagem independente e flexível de analogia de classe (SIMCA)

Este método executa uma PCA para todas as classes individualmente. Obtém-se a semelhança entre as amostras pertencentes à classe correspondente, seguida da determinação do número de PCs capazes de explicar a variabilidade do conjunto de dados, definindo assim o chamado espaço interno. Este espaço contém as informações mais relevantes para a correta interpretação do modelo. Para validar

as análises de reconhecimento de padrões, o mesmo procedimento foi usado no PLS-DA. (BRERETON, 2015; OLIVERI, PAOLO; DOWNEY, 2012)

Uma das principais vantagens do SIMCA é que, por se tratar de uma técnica de classificação “flexível”, um objeto pode ser classificado em uma, várias ou nenhuma classe. Se um objeto desconhecido pertencer a mais de uma classe, este resultado pode indicar que as respostas usadas para construir o modelo de classificação não têm poder suficiente para discriminar entre as classes ou que pode haver um erro na medição. Uma das principais desvantagens do SIMCA é que ele requer análise prévia por PCA; o resultado depende da escolha dos PCs, o que é facilitado pelo número mínimo para o qual o conjunto de treinamento está corretamente classificado. SIMCA é sensível a outliers, mas eles podem ser reconhecidos pelo método.

O método SIMCA consiste em duas etapas: Na primeira etapa, PCA (Equação 1) é aplicado aos dados de treinamento extraídos da classe de pré-definida. Na segunda etapa, os resultados do PCA são usados para calcular dois parâmetros, a distância de scores, h_i , e as distâncias ortogonais para cada objeto $i = 1, \dots, I$ do conjunto de treinamento. Como mostrado na Equação 2 a distância, v_i :

$$h_i = t_i^t (T^t T)^{-1} t_i, \quad v_i = \sum_{j=1}^J e_{ij}^2 \quad (2)$$

A distância de scores representa a posição de uma amostra dentro do espaço de pontuação, e a distância ortogonal caracteriza uma distância de amostra para o espaço de scores. O SIMCA é capaz de caracterizar os resultados da classificação de forma estatisticamente sólida, ou seja, calcular os erros de classificação incorreta com base em princípios teóricos. Tanto a distância do escore quanto a distância ortogonal seguem a distribuição em escala e, portanto, oferecem a possibilidade de desenvolver áreas de tolerância. (BRERETON, 2015; FORINA *et al.*, 2008; GRANATO *et al.*, 2018)

1.11 VALIDAÇÃO ANALÍTICA MULTIVARIADA

A maior dificuldade para a validação de métodos multivariados tem sido a escassez de procedimentos específicos e regulamentação oficial apropriada. Na área de alimentos e bebidas, tanto os guias oficiais brasileiros quanto os

internacionais não consideram os aspectos multivariados intrínsecos ao desenvolvimento de métodos multivariados. (INMETRO, 2011; AOAC, 2012).

A validação analítica foi realizada a fim de harmonizar conceitos univariados e multivariados. Neste sentido, este trabalho procurou adaptar os requisitos das diretrizes brasileiras e internacionais para o estado do arte de como estimar figuras de méritos (FOM). (INMETRO, 2011; AOAC, 2012).

1.11.1 Seleção de amostras

1.11.1.1 Algoritmo de Kennard-Stones

Este método seleciona as amostras que estão mais dispersas no espaço amostral. As distâncias euclidianas são calculadas entre as amostras. As duas amostras com a maior distância entre si são selecionadas primeiro.

Em seguida, amostras adicionais são adicionadas à lista por dois critérios: o primeiro para cada amostra ainda não na lista, determina-se o seu vizinho mais próximo entre as seleções atuais e segundo seleciona-se a amostra cujo vizinho é o mais distante possível. (KENNARD; STONE, 1969)

1.11.2 Seleção de variáveis

Métodos baseados em fatores, quando aplicados a dados de alta relação sinal-ruído, são muito bons em isolar sinal de ruído, resultando em redução de dimensionalidade. No entanto, se muitas variáveis correlacionadas estiverem presentes, essa habilidade pode ser confundida. Assim, para alguns dados, pode ser benéfico remover variáveis sem importância. O software Pirouette oferece algumas rotinas simples de seleção de variáveis.

1.11.3 Figuras de méritos

Uma maneira de avaliar o desempenho dos modelos quimiométricos é utilizar alguns parâmetros, como sensibilidade, especificidade e taxa de classificação correta. A veracidade de métodos de classificação pode ser aferida a partir dos cálculos das figuras de mérito baseadas nos valores dispostos nas tabelas de contingência resultantes. (OLIVIERI, 2018)

		Resultado real	
		Verdadeiro	Falso
Resultado previsto	Verdadeiro	VP	FP
	Falso	FN	VN

Na tabela 5, os resultados das classificações das amostras são apresentados da seguinte forma: número de amostras classificadas como verdadeira positiva (VP), número de amostras classificada corretamente como verdadeira negativa (VN), o número de amostras classificadas erroneamente como falso positivo (FP) e número de amostras classificadas erroneamente como falso negativo (FN).

2 OBJETIVOS

Desenvolvimento de metodologias analíticas eficazes para classificação e discriminação de cervejas brasileiras empregando a técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H aliada a abordagens quimiométricas.

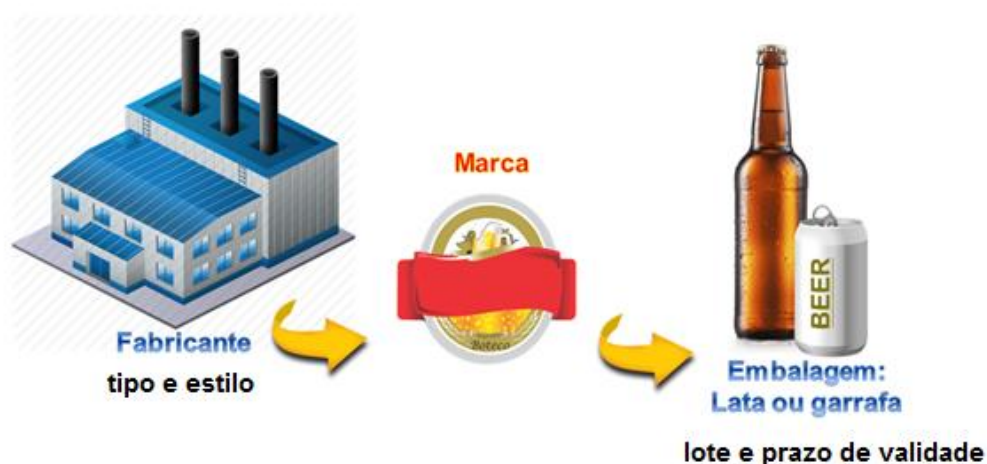
3 MATERIAIS E METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAGEM

As amostras de cervejas foram selecionadas de acordo com: o tipo, estilo, fabricante, marca, lote, embalagem e prazo de validade. Para cada marca de cerveja analisada foram coletadas 3 amostras, produzidas em lotes e embalagens diferentes (latas e garrafas). No total foram analisadas 43 fabricantes de cervejas, 49 marcas, sendo envasadas em garrafas e latas.

Na Figura 18 mostra-se um esquema do processo de amostragem completo.

Figura 18- Esquema de amostragem: Escolha do fabricante, tipo e estilo de cerveja, a marca, o tipo de embalagem, o lote e o prazo de validade.



Fonte: Autor

3.2 MEDIDAS DE POTENCIAL HIDROGENIÔNICO

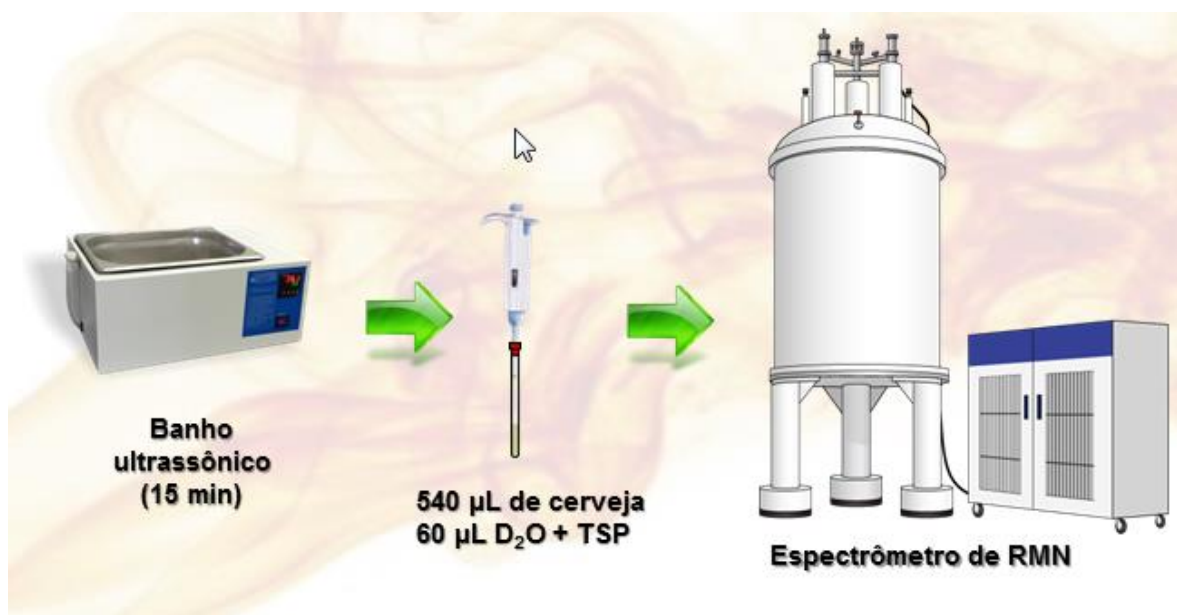
O potencial hidrogeniônico (pH) foi medido (em triplicata) em volumes de 50 mL das cervejas descarbonatadas, utilizando um medidor de pH (Modelo 692 pH / Ionmetro, Metrohm-Herisau, Suíça) equipado com um eletrodo combinado e uma sonda de temperatura, seguindo o método padrão.

3.3 PREPARO DE AMOSTRA

As amostras foram mantidas em ambiente arejado, sem umidade e na ausência de luz durante todo o período de armazenamento. O preparo das amostras para análise por espectroscopia de RMN de ^1H consiste primeiramente em colocar 50 mL em um bquer afim de desgaseificar a amostra utilizando um banho ultrassônico por 5 minutos ou até cessar o aparecimento de bolhas de gás carbônico, como pode ser visto na Figura 19.

Em seguida, uma alíquota de 540 μL da amostra desgaseificada e 60 μL de água deuterada (D_2O) + 0,05% de ácido trimetilsililpropanóico (TSP) são homogeneizados e colocados em um tubo de RMN de 5 mm (DA SILVA; FLUMIGNAN; TININIS; *et al.*, 2019; KUBALLA *et al.*, 2018).

Figura 19 – Ilustração do procedimento de preparo de amostra de cerveja para análise em RMN de ^1H .



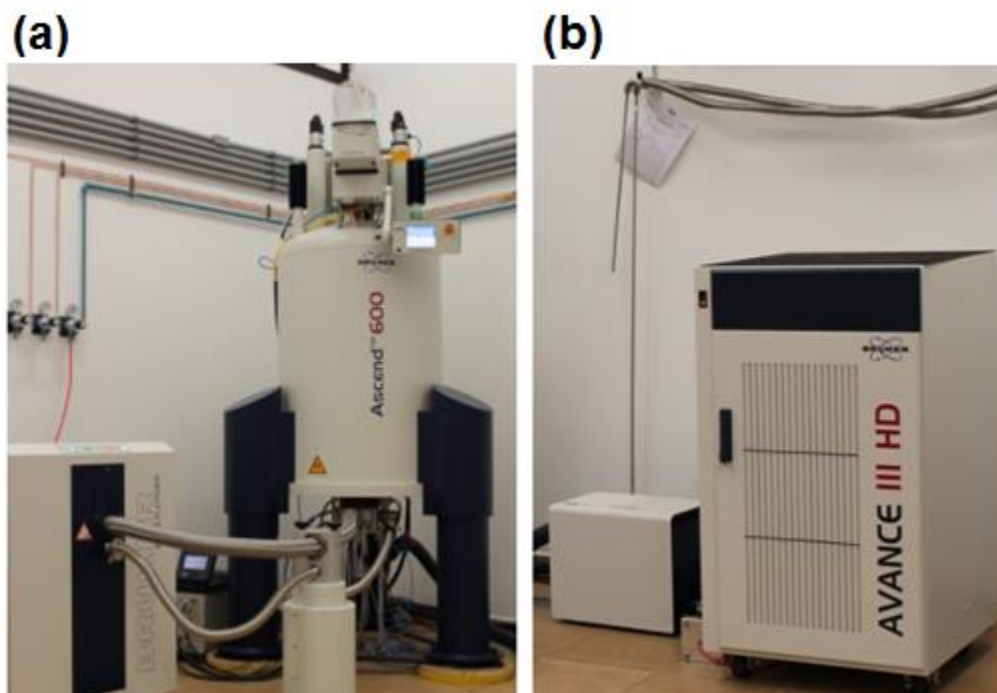
Fonte: autor

3.4 ESPECTROS DE RMN DE ^1H

Os espectros de RMN de ^1H para as amostras de cerveja foram adquiridos utilizando um espectrômetro Bruker Avance III HD 600 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemanha) operando a 14,1 Tesla (600,13 MHz para ^1H). O instrumento foi equipado com um Triplo Inverse TCI Cryo-probe, ajuste automatizado, um acessório de controle de temperatura BCU (Bruker Cooler Unit I).

O espectrômetro Avance 600 possui uma configuração diferenciada, pois além da sonda convencional, ele está equipado com uma sonda criogênica e um repositor automático de amostras. (Figura 20)

Figura 20 (a) Espectrômetro Avance 600 e a (b) sonda criogênica



Fonte: <https://www.iq.unesp.br/#!/laboratorios-ultiusuarios/rmn4419/laboratorio-ii/bruker-avance-iii-600/>

A sonda criogênica TCI aumenta consideravelmente a relação sinal/ruído dos núcleos de ^1H e ^{13}C e ^2H e possui um canal dedicado para o núcleo de ^{15}N . Sua configuração permite a realização de experimentos de RMN 3D, reduzir drasticamente o tempo experimental, analisar amostras extremamente diluídas, além de fornecer uma elevada estabilidade de campo, o que permite realizar experimentos em $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) por um longo tempo experimental.

O software Icon NMR (Bruker) foi usado para controlar todo o processo de ajuste do equipamento e aquisição dos dados. As amostras foram analisadas a 303,1 K após 5 minutos para o equilíbrio da temperatura. Para todos os espectros a supressão do sinal de água foi realizada utilizando uma sequência de pulso denominada “zgcprr”.

Os números de varreduras foram definidos como 64 e 4, respectivamente. Os decaimentos de indução livres (FIDs) foram coletados em 32768 (32k) pontos de

dados usando um pulso de 90°, largura espectral de 12,02 ppm, tempo de aquisição de 2,3 s e transformação com ampliação de linha (LB = 0,3 Hz).

Os espectros foram automaticamente faseados e corrigidos na linha de base usando o pacote de software TopSpin 4.0.7 (Bruker Biospin, Rheinstetten, Alemanha). O tempo de análise para cada amostra foi de 5 minutos (DA SILVA; FLUMIGNAN; TININIS; *et al.*, 2019).

3.5 ALINHAMENTO ESPECTRAL

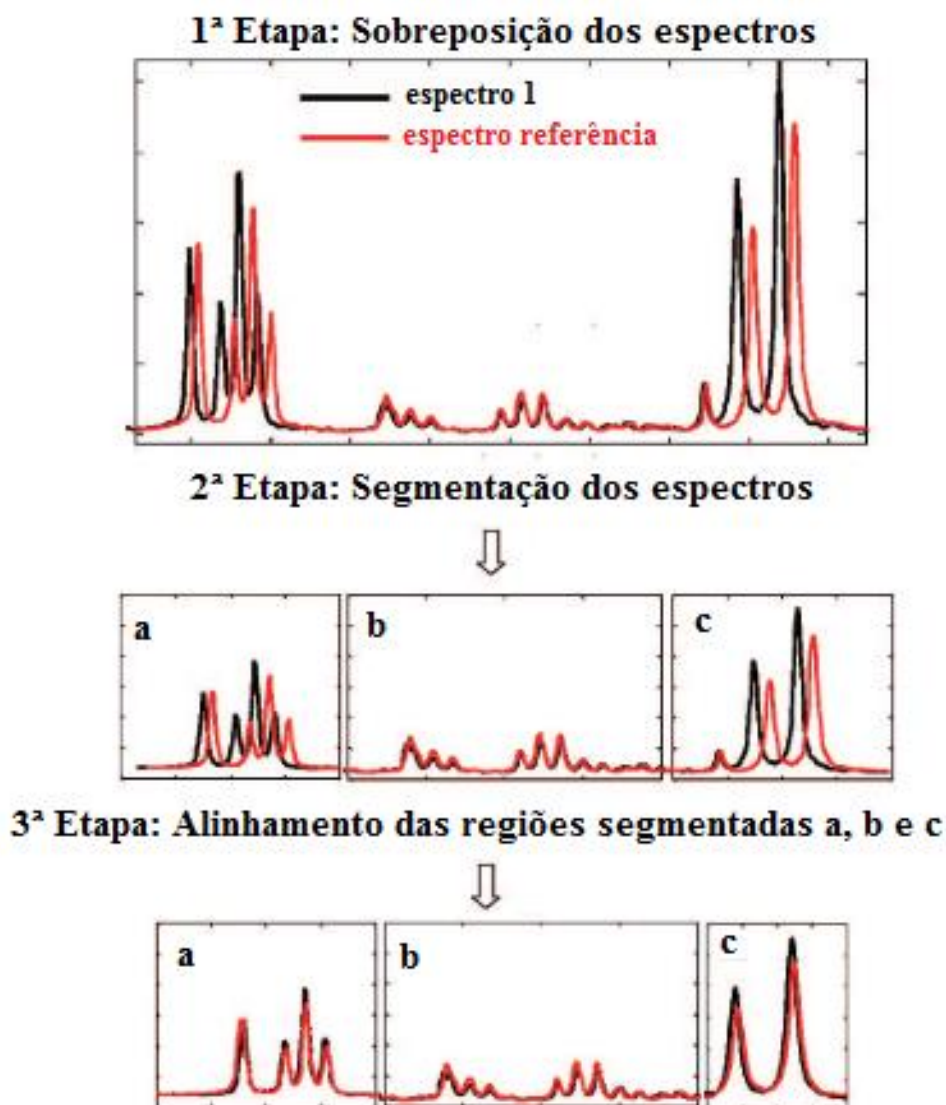
O desalinhamento espectral foi causado por pequenas variações de pH e interações intermoleculares entre os compostos químicos. O principal objetivo do procedimento de alinhamento é ajudar a assegurar a interpretação correta dos resultados das análises multivariadas, através da correlação entre um espectro de referência escolhido e os conjuntos de sinais a serem alinhados.

O método de alinhamento de pico segmentar recursivo (Recursive Segment-wise Peak Alignment, RSPA) foi usado para alinhar todos os segmentos do espectro (MACKINNON *et al.*, 2012). Todos os sinais foram reconhecidos através do cruzamento zero da derivada de primeira ordem calculada usando um polinômio de terceira ordem de acordo com o método de alinhamento Savitsky-Golay (SAVITVZKY; GOLAY, 1964).

O alinhamento do segmento de teste foi aceito, sujeito a um avanço na qualidade do alinhamento entre os picos. Os espectros foram então alinhados usando um único espectro de referência.

Na primeira etapa os espectros são sobrepostos junto ao espectro de referência, em seguida os picos desalinhados são identificados (Figura 20). A segunda etapa é a segmentação dos espectros diferentes regiões e finalmente na terceira etapa o alinhamento das regiões espectrais é executado ordem de acordo com o método de alinhamento Savitsky-Golay.

Figura 21 - Ilustração do procedimento de alinhamento espectral em três etapas: 1ª etapa: sobreposição, 2ª etapa: segmentação e 3ª etapa: alinhamento segmentar.



Fonte: Adaptado de (MACKINNON *et al.*, 2012; VESELKOV *et al.*, 2009)

3.6 CONSTRUÇÃO DA MATRIZ DE DADOS

A construção da matriz de dados foi feita organizando os espectros de forma sucessiva, onde as amostras são posicionadas nas linhas e os deslocamentos químicos são posicionados nas colunas. Os sinais indesejáveis como residual de água, sinais de etanol podem ser removidos manualmente da matriz de dados.

Para a Análise em Componentes Principais (PCA) foram construídas matrizes dos espectros das amostras, de diferentes dimensões.

Na análise dos espectros de RMN, foram usados os espectros inteiros (0,5 a 10,4 ppm), excluindo os sinais da água (4,77 ppm) e do etanol (1,17 e 3,65 ppm), seguindo-se a análise das sub-regiões dos espectros – alifática (3,1 – 0,5 ppm), açúcares (5,8 – 3,1 ppm) e aromática (10 – 5,8 ppm). Estas matrizes foram depois normalizadas e tratadas usando um programa estatístico Pirouette

3.7 PRÉ-TRATAMENTO DOS DADOS

Antes da análise multivariada dos dados, as matrizes de dados utilizadas devem ser pré-tratadas para fins multivariados, a fim de evitar possíveis artefatos que poderiam introduzir algumas variações sistemáticas e aleatórias nas matrizes de dados.

As etapas envolvidas no pré-tratamento de dados normalmente consistiam no em: processamento de dados, normalização de dados e escalonamento de dados.

3.7.1 Processamento dos dados

O deslocamento de pico é um grande problema em espectroscopia, atribuído principalmente ao desvio instrumental, variação aleatória ou química da amostra (por exemplo, solvente, pH), sendo este último considerado a maior fonte de deslocamento de pico. O método tem sido usado para superar o problema, nomeado de alinhamento de pico.

O alinhamento de picos é uma alternativa, sendo utilizado em métodos espectroscópicos. A maioria dos métodos de alinhamento funciona alinhando apenas pares de amostras ou amostras múltiplas contra uma amostra ou modelo de referência previamente selecionado.

3.7.2 Normalização

A normalização de espectros no caso de métodos espectroscópicos é necessária para reduzir ou minimizar os efeitos das variações sistemáticas da concentração geral das amostras.

Um dos métodos de normalização mais comumente aplicados é a normalização para área total, que envolve definir cada observação para ter intensidade total da unidade, expressando cada ponto de dados como uma fração da integral de observação total. (DUARTE, I. *et al.*, 2002)

3.7.3 Escalonamento

A etapa final opcional de pré-tratamento é o escalonamento de dados, que é uma operação de coluna (ou seja, em cada variável em todas as amostras), visando a ponderação das variáveis de dados. Vários desses métodos de escalonamento são comumente usados, a saber, centralização da média e variação da unidade. Nesses métodos de escala, cada coluna pode receber uma média de zero subtraindo a média da coluna de cada valor na coluna (método de centralização da média). Em segundo lugar, cada coluna pode ser escalonada de modo que tenha: variância unitária (dividindo cada variável na coluna pelo desvio padrão da coluna e, portanto, dando peso igual a cada variável). (GRANATO *et al.*, 2018)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 DIFERENCIAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE CERVEJAS LAGER DE DIFERENTES ESTILOS

A espectroscopia de RMN permite detectar, simultaneamente, em um único experimento, várias classes de compostos químicos, em diferentes concentrações e já mostrou elevada potencialidade no estudo da composição química de vários produtos alimentares e bebidas alcóolicas e não alcóolicas, tais como, sucos de fruta (VOGELS *et al.*, 1996), café (IZABEL *et al.*, 2020; TOCI *et al.*, 2018), vinho (FAN *et al.*, 2018), e cerveja (DA SILVA; FLUMIGNAN; TININIS; *et al.*, 2019; DAL POGGETTO, GUILHERME *et al.*, 2019; ISAAC-LAM, 2016; JOHNSON *et al.*, 2017; SÁNCHEZ-ESTÉBANEZ *et al.*, 2018).

A principal vantagem de ser uma técnica não destrutiva (a amostra é usada diretamente, sem qualquer tipo de pré-tratamento). No caso da cerveja, é suficiente degaseificar a amostra e em poucos minutos podemos obter um espectro que fornece informação detalhada sobre a sua composição química.

A espectroscopia de RMN tem sido, maioritariamente, aplicada na resolução de problemas específicos, tais como, identificação e quantificação dos constituintes do malte e do lúpulo. (CABALLERO; BLANCO; PORRAS, 2012; SPEVACEK *et al.*, 2016)

É de todo o interesse desenvolver métodos que analisem cerveja não só para simplificar o procedimento experimental, como para reduzir o tempo de análise e aumentar o número de compostos analisados e simultaneamente sejam capazes de discriminar amostras de cervejas diferentes.

As cervejas do tipo lager são consumidas preferencialmente no Brasil. Vários estilos diferentes de cerveja lager podem ser obtidos através da combinação de ingredientes. Os estilos mais famosos são Standard American Lager e Premium Standard Lager, a principal diferença entre eles é a fonte de açúcares fermentáveis. O estilo Standard permite a substituição parcial do malte de cevada por fontes alternativas de açúcares, denominado adjunto. Enquanto o estilo Premium apenas malte de cevada é utilizado para preparar o mosto cervejeiro (GRANATO *et al.*, 2011).

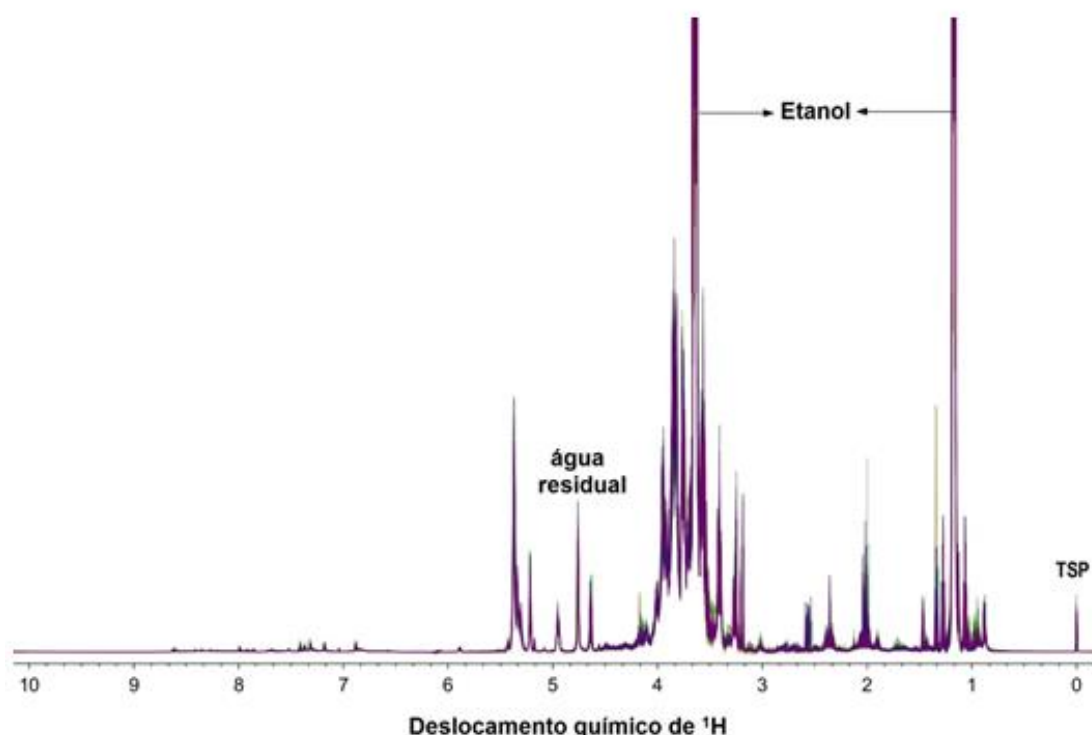
As cervejas são matrizes bastante complexas, com os principais componentes: água, etanol e açúcares entre outros componentes minoritários como

ácidos orgânicos, lipídeos, proteína e aminoácidos. (ALMEIDA, C. *et al.*, 2006; DUARTE, I. F. *et al.*, 2004).

A Figura 22 mostra uma sobreposição dos espectros de RMN de ^1H no intervalo de 0 a 10 ppm para o conjunto de quarenta cervejas do tipo lager. Os sinais para etanol (1,17 e 3,65 ppm), água residual (4,76 ppm) e o padrão de referência de deslocamento químico TSP (0,00 ppm) são destacados.

As pequenas variações de pequena magnitude observadas nos sinais de ressonância podem ser causadas por diferenças de pH ou interações intermoleculares entre os compostos químicos presentes na cerveja como pode ser visto para os sinais de 2,04, 2,35 e 2,57 ppm correspondentes aos ácidos acético, pirúvico e succínico, respectivamente (LIU *et al.*, 2012; MONAKHOVA *et al.*, 2011).

Figura 22- Espectros de RMN de ^1H para amostras de cerveja (n=40). Espectro de RMN de ^1H de 0-10 ppm



Fonte: (DA SILVA; FLUMIGNAN; TININIS; *et al.*, 2019)

Isso pode ser o motivo de pequenos desalinhamentos espectrais. Isso dificulta a interpretação e comparação entre os espectros nesta região espectral. Uma possível estratégia a ser adotada para superar essa dificuldade seria observar regiões individuais onde há maior possibilidade de alinhamento dos sinais de

ressonância, mais simples do que usar algoritmos de pré-processamento ou operações de “binning” (nome dado ao tratamento matemático utilizado para reduzir o tamanho dos dados espectrais).

Sendo assim, os espectros foram alinhados manualmente usando o sinal de etanol δ (CH_2) a 3.65 ppm como ponto de alinhamento espectral para uma amostra de referência. A amostra 17 (Tabela 6) foi selecionada como referência, pois o valor do pH e a intensidade do álcool foram iguais aos valores médios comparado a todo o conjunto amostral. Esse procedimento evitou a possibilidade de que pequenas variações no deslocamento químico, especialmente na região de carboidratos, pudessem contribuir para agrupamentos falsos ou equivocados.

Tabela 6- Atributos físico-químicos de cervejas brasileiras do tipo lager de estilos diferentes (n=40).

Amostra	Estilo de cerveja	Fonte de Carboidrato [*]	Etanol ^a (% v/v)	pH ^b
1	Premium American	Puro malte	4,4	4,40
2	Premium American	Puro malte	4,5	4,51
3	Premium American	Puro malte	5,0	4,56
4	Premium American	Puro malte	5,5	4,48
5	Premium American	Puro malte	5,1	4,40
6	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	5,0	4,06
7	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,7	4,10
8	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,9	4,07
9	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,8	4,09
10	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,5	3,96
11	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,5	4,19
12	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,6	4,16
13	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	5,0	4,03
14	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,5	3,98
15	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	5,0	4,03
16	Premium American	Puro malte	6,0	4,59
17	Premium American	Puro malte	4,8	4,35
18	Premium American	Puro malte	4,8	4,45
19	Premium American	Puro malte	5,5	4,21
20	Premium American	Puro malte	5,0	4,45
21	Premium American	Puro malte	5,5	4,69
22	Premium American	Puro malte	4,8	4,80
23	Premium American	Puro malte	4,8	4,43
24	Premium American	Puro malte	5,0	4,39
25	Premium American	Puro malte	4,5	4,59
26	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,7	4,42
27	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,7	4,20
28	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,5	4,24
29	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,6	4,15
30	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,7	4,30
31	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,5	3,91
32	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,5	4,27
33	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	5,0	4,27
34	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,7	4,01
35	Standard American	Malte de cevada e adjunto [*]	4,6	4,27
36	Premium American	Puro malte	6,2	4,61
37	Premium American	Puro malte	4,2	4,91
38	Premium American	Puro malte	5,0	4,66
39	Premium American	Puro malte	4,7	4,28
40	Premium American	Puro malte	5,0	4,38

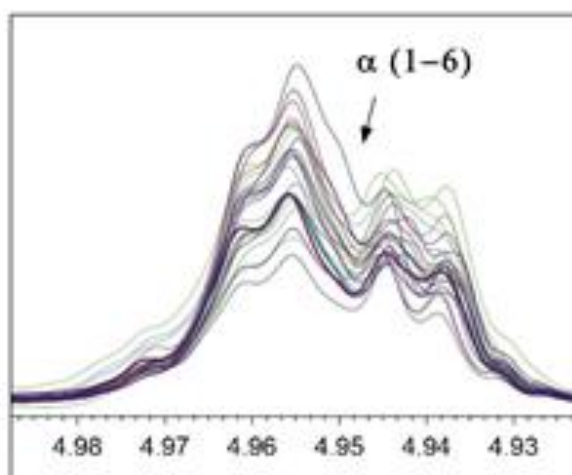
^a de acordo com o rótulo^b coeficiente médio de variação = 1,2%^{*} não há informações sobre o tipo e quantidade de adjunto utilizado na fabricação de cada cerveja.

O alinhamento dos espectros foi fundamental para poder comparar os dados para as amostras de cerveja e identificar as principais fontes de variabilidade, de modo que a região de carboidratos (3,0-6,0 ppm) foi selecionada para a aplicação de PCA, pois nessa região os sinais estavam perfeitamente alinhados.

A Figura 23 apresenta a região anomérica (4,95 ppm) associada a maltooligossacarídeos e dextrinas contendo α -1,6 ligações glicosídicas que não podem ser clivadas pelas enzimas β -amilase, o que poderia ser indicativo de conversão incompleta do amido em fermentável açúcares (BOULTON, 2013).

A atribuição dos sinais de prótons anoméricos foi baseada em experimentos de RMN e informações já bem descritas na literatura (DAL POGGETTO *et al.*, 2017; DUARTE *et al.*, 2002; PETERSEN, BENT O., MATHIAS NILSSON; SCHIEVANO; TONOLI; RASTRELLI, 2017)

Figura 23- Região anomérica (4,95 ppm) associada a maltooligossacarídeos e dextrinas



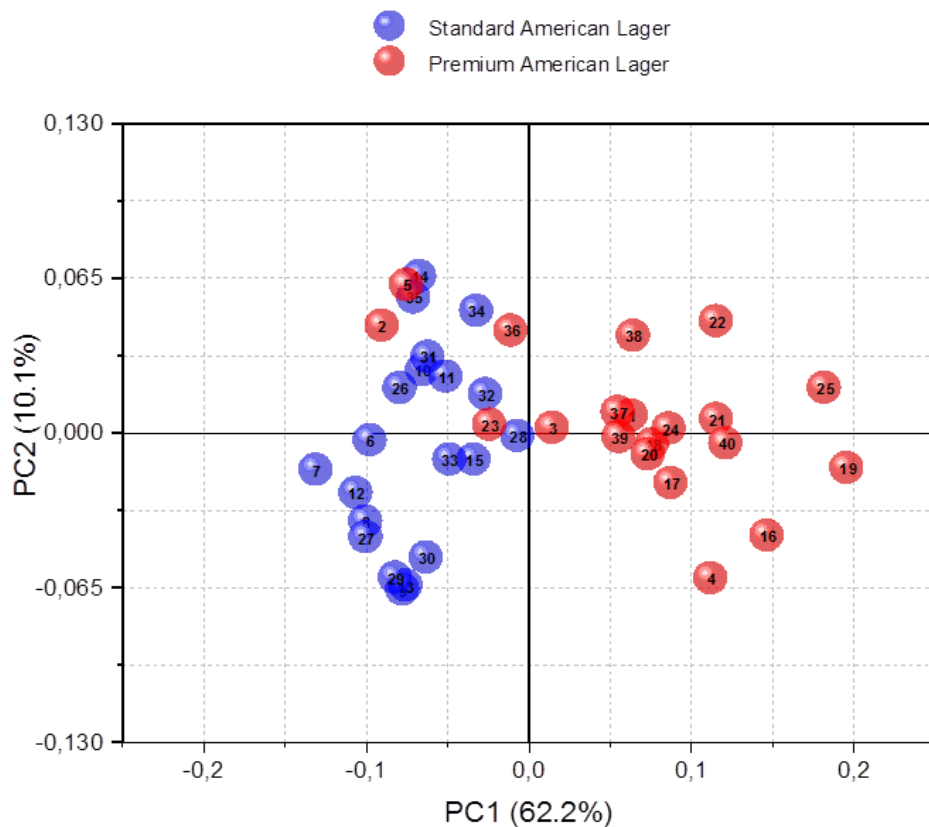
Fonte: Autor

O gráfico dos resultados da PCA para os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2), mostrados na Figura 24, pode ser notado a presença de dois grupos, Premium American Lager (Esferas vermelhos) e Standard American Lager (Esferas azuis), uma pequena região onde as amostras Premium e Standard American Lager encontram-se sobrepostas, isso pode ser explicado pela composição de açúcares bastante similar entre os conjuntos de amostras, devido a uma série de fatores, por exemplo: processo de fabricação escolhido pelos

fabricantes, matéria-prima de natureza e composição similares, cultura de leveduras empregadas na fermentação, etc.

Os dois primeiros PCs representaram 72,3% da variabilidade dos dados (PC1 = 62,2%; PC2 = 10,1%).

Figura 24- Gráfico de scores da PCA de amostras de cerveja (n=40). ● Premium American Lager, ● Standard American Lager.

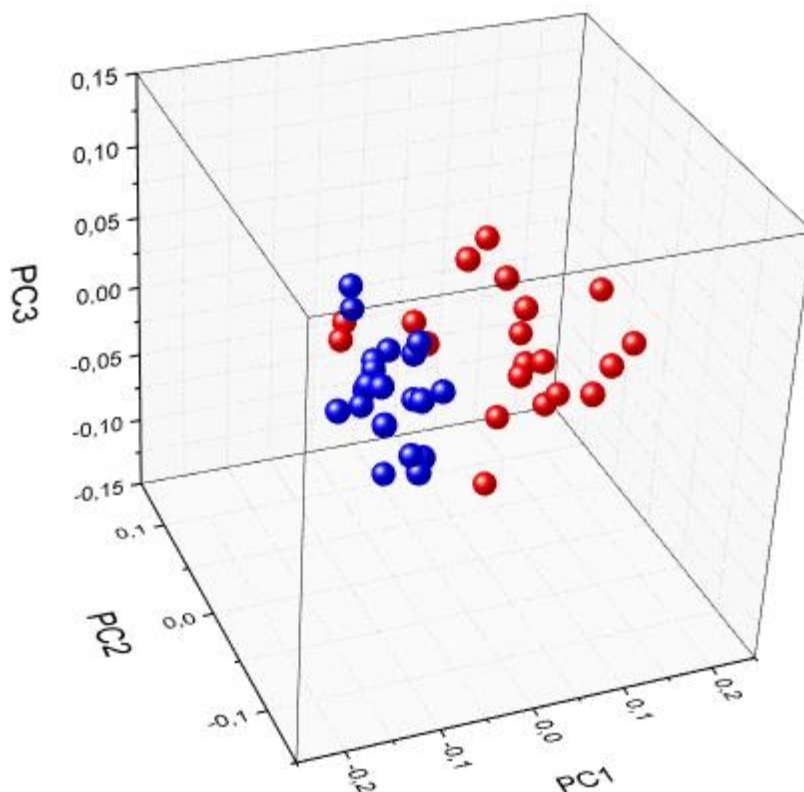


Fonte: (DA SILVA; FLUMIGNAN; TININIS; *et al.*, 2019)

A Figura 25 mostra o gráfico de escores para os três primeiros componentes, que juntos explicaram 81,5% da variabilidade do conjunto de dados (PC3 = 9,2%). Pode ser observada uma maior dispersão nas cervejas do estilo Premium American Lager, em comparação com as cervejas do estilo Standard American Lager.

Isso provavelmente tenha ocorrido devido à tecnologia empregada pelas grandes cervejarias na produção da Standard American Lager, com cervejas bastante similares.

Figura 25- Gráfico de scores de PCA tridimensional. ● Premium American Lager, ● Standard American Lager.



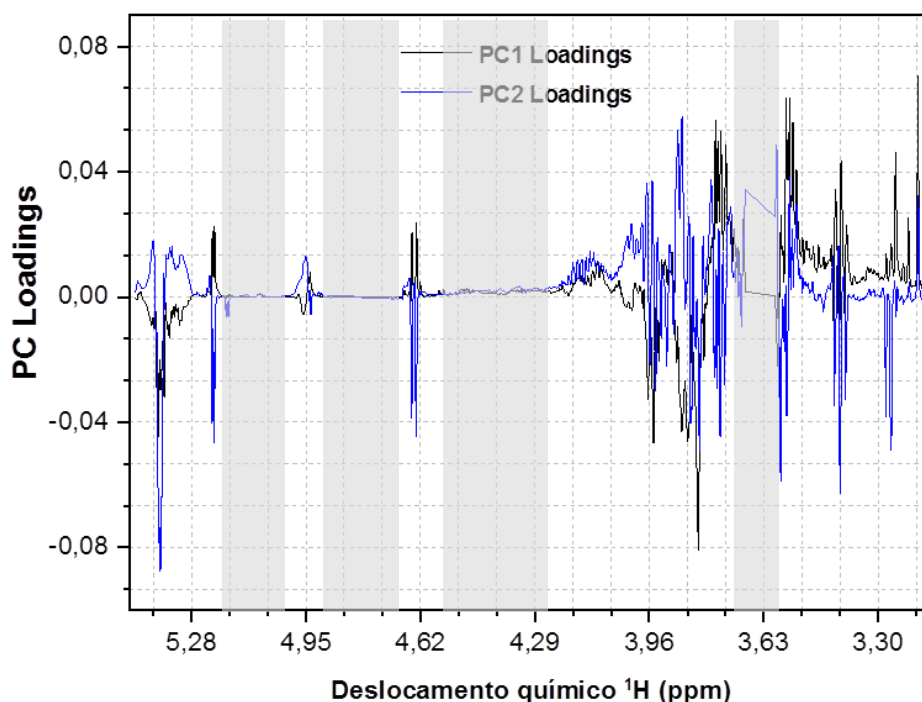
Fonte: (DA SILVA; FLUMIGNAN; TININIS; *et al.*, 2019)

As grandes cervejarias têm investido muito na produção e comercialização do estilo Premium American Lager, embora pequenas cervejarias sejam responsáveis pela produção das melhores cervejas Premium American.

Além disso, conquistaram a preferência do consumidor brasileiro. Por esta razão, as cervejarias multinacionais têm procurado adquirir cervejarias nacionais promissoras, a fim de aumentar a variedade de cervejas disponíveis para os consumidores e expandir o campo de seus negócios de cerveja através da ampliação de variedades de produtos ofertados aos clientes.

Os gráficos de loadings (pesos) na Figura 26 mostram as contribuições dos carboidratos para a separação das amostras de cerveja mostradas nos gráficos de escores. Os pesos de PC1 revelaram valores positivos para os sinais correspondentes aos maltooligossacarídeos e maltose (5,22, 4,63, 3,41 e 3,27 ppm), indicando que estes compostos estavam presentes em maiores concentrações relativas nas cervejas Premium American.

Figura 26- Gráfico de loadings das componentes principais PC1 e PC2. Em destaque região de seleção de variáveis. Regiões destacadas são desconsideradas através de seleção de variáveis.



Fonte: (DA SILVA; FLUMIGNAN; TININIS; *et al.*, 2019)

Por outro lado, os pesos de PC1 apresentaram valores negativos nas posições correspondentes ao próton anomérico das dextrinas (5,31, 5,34 e 5,37 ppm), indicando que esses açúcares estavam presentes em maiores concentrações relativas nas cervejas Standard American Lager.

Uma possível explicação para isso poderia ser o uso de enzimas exógenas durante o processo de fermentação, que atua para aumentar substancialmente o teor de açúcar fermentável. Os pesos de PC2 poderiam ser usadas para esclarecer a sobreposição de amostras na região positiva.

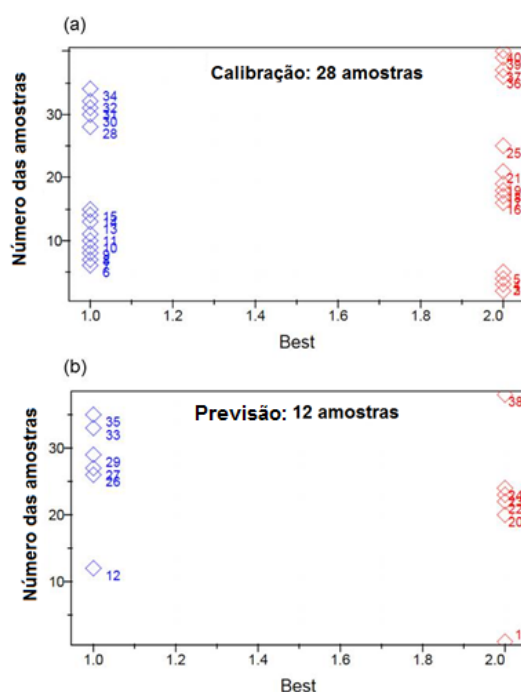
As contribuições significativas dos sinais de prótons anoméricos de diferentes açúcares (5,37 e 4,95 ppm) poderiam ter sido devidas a atividade ineficiente de enzimas endógenas durante o processo de esmagamento do malte na preparação do mosto, especialmente β -amilase (PETERSEN, BENT O., MATHIAS NILSSON, 2014), que apenas hidrolisa α -1,4 ligações e é incapaz de clivar as ligações α -1,6, representadas pelo sinal a 4,95 ppm (BOULTON, 2013).

O modelo PLS-DA foi construído com as duas classes: 1 (Standard American Lager) e 2 (Premium American Lager). O modelo de análise discriminante foi

validado por meio da validação cruzada e do número de variáveis latentes (3), pré-processadas e matematicamente transformadas por centralização de média, normalização e suavidade.

Os conjuntos de treinamento e teste foram definidos utilizando-se o algoritmo Kennard-Stone para as amostras de cada marca de cerveja isoladamente. Essa etapa selecionou os espectros médios de 28 amostras para o conjunto de treinamento e de 12 para o conjunto de teste para cada uma das classes. Usando esse modelo foi possível discriminar estilos de cervejas com poder de 100% nos conjuntos de calibração e previsão (Tabela 7). Os resultados da análise PLS-DA na Figura 24 revelaram que nenhuma amostra do conjunto de treinamento e previsão foi classificada erroneamente.

Figura 27- Resultado de análise discriminante obtida pela PLS-DA para conjunto de calibração e previsão



Fonte: (DA SILVA; FLUMIGNAN; TININIS; *et al.*, 2019)

A análise foi repetida usando uma abordagem de modelagem por meio do algoritmo SIMCA, onde 4 PCs foram selecionados para o modelo e os resultados correspondentes são relatados na, modelo SIMCA foi possível discriminar estilos de cervejas com uma taxa de classificação correta de 96,4% na calibração e 91,6% nos conjuntos de previsão.

Tabela 7- Resultados obtidos com os modelos PLS-DA e SIMCA

Método	Classe (lager)	Transformações matemáticas	VL/PC*	Taxas de classificação correta (%)	
				Treinamento	Previsão
PLS-DA	Premium American	Normalização	3	100% (14/14)	100% (6/6)
	Standard American		3	100% (14/14)	100% (6/6)
	Total			100% (28/28)	100% (12/12)
SIMCA	Premium American	Normalização	4	92,9% (13/14)	100% (6/6)
	Standard American		4	100% (14/14)	83,3% (5/6)
	Total			96,4% (27/28)	91,6% (11/12)

*VL: Variável latente; PC: Componente Principal.

Os resultados apresentado anteriormente, revelam especificamente a possibilidade de discriminar cervejas por estilo, de acordo com a informação do rótulo e espectros de RMN de ^1H .

Os resultados obtidos indicaram que a análise quimiométrica utilizando análises exploratórias (PCA) e discriminantes (PLS-DA) pode ser empregada em um primeiro passo para construir um procedimento de classificação completo, com base na matéria-prima utilizada no processo de fabricação.

Considerando que, todos os métodos quimiométricos de reconhecimento de padrões foram bem sucedidos na etapa de treinamento e previsão das classes de cerveja, e os modelos produzidos podem ser utilizados como uma triagem utilizada para autenticação do estilo de cerveja.

Esses resultados podem ser interessantes para o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão do governo que tem a tarefa de verificar a autenticidade e a qualidade dos alimentos de origem animal e das bebidas alcoólicas, não alcoólicas e fermentadas.

A qualidade e o controle de autenticidade da cerveja são de grande importância tanto para a indústria cervejeira, cuja responsabilidade é fornecer uma rotulagem clara e precisa de seus produtos, quanto para os consumidores.

É importante enfatizar que a avaliação dos itens acima mencionados é fundamental para que as cervejarias possam atender às mudanças nas exigências do comércio e dos consumidores e tornar suas marcas mais lucrativas (OLIVERI, P.; SIMONETTI, 2016). Entretanto, leis mais severas devem ser criadas para obrigar as

cervejarias a fornecer informações completas sobre os ingredientes usados na fabricação do produto.

As descrições dos ingredientes no rótulo (água, malte de cevada, cereais não maltados ou hidratos de carbono e lúpulo) são insuficientes e não permitem ao consumidor obter informações adequadas sobre a especificação das quantidades dos ingredientes e as características do produto.

4.2 DIFERENCIAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE CERVEJAS LAGER DO MESMO ESTILO (STANDARD AMERICAN LAGER) POR CERVEJARIA.

A produção nacional de cerveja ocupa uma posição de destaque no cenário mundial, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de cerveja. No entanto, a produção de quase 98% das cervejas lager consumidas no país esteja restrita apenas três grandes cervejarias: Ambev, Heineken e Grupo Petrópolis. As principais marcas dessas cervejarias são comercializadas por preços de mercado um pouco diferente (GRANATO *et al.*, 2011).

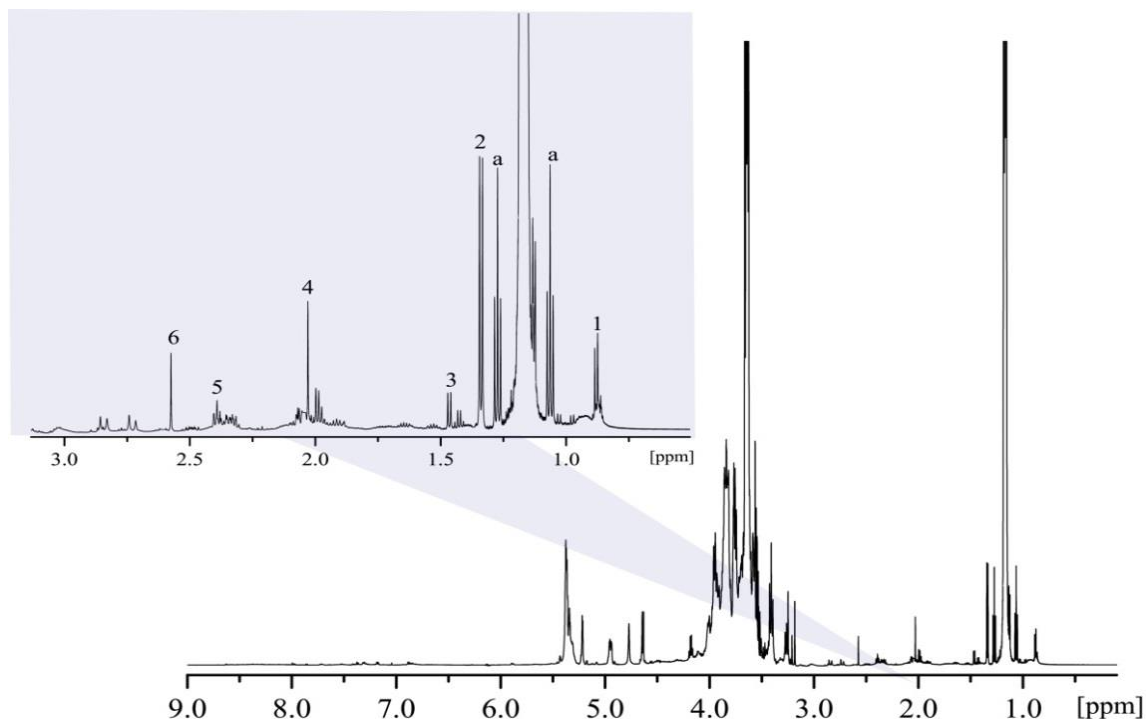
Por questões econômicas processos fraudulentos ocorrem constantemente. O procedimento mais comum consiste em substituir rotulo e tampas de marcas mais baratas por marcas mais caras, com a finalidade de aumentar o lucro na venda destes produtos adulterados, (PEREIRA *et al.*, 2016).

Esse tipo de fraude é difícil de ser detectada, pois não há nenhuma adição ou alteração na bebida. Portanto métodos capazes de identificar esse tipo de fraude são necessários e ajudariam muito as autoridades no combate deste tipo de crime.

A espectroscopia de RMN permite avaliar uma ampla faixa espectral contendo informações sobre centenas de compostos químicos em um único experimento. Além disso, pode ser considerado um dos melhores métodos de controle de qualidade de bebidas e alimentos sem conhecimento prévio sobre a composição da amostra.

O espectro de RMN de ^1H é mostrado na Figura 28 onde a parte inferior fornece o espectro total δ 0-9 ppm .

Figura 28- Espectro de RMN de ^1H para cerveja do estilo Standard American. Ampliação da região alifática (0-3 ppm).



Fonte: (DA SILVA; FLUMIGNAN; PEZZA; *et al.*, 2019)

Na parte superior mostra detalhes da região alifática δ 0-3 ppm, destacando os principais ácidos orgânicos são mostrados na Tabela 8. Primeiramente, diferentes regiões do espectro foram analisadas, assim como o espectro total. No entanto, o uso da região alifática por si só foi mais promissor, com clara separação entre os grupos.

Tabela 8- Assinalamento dos sinais de RMN de ^1H para amostras de cerveja

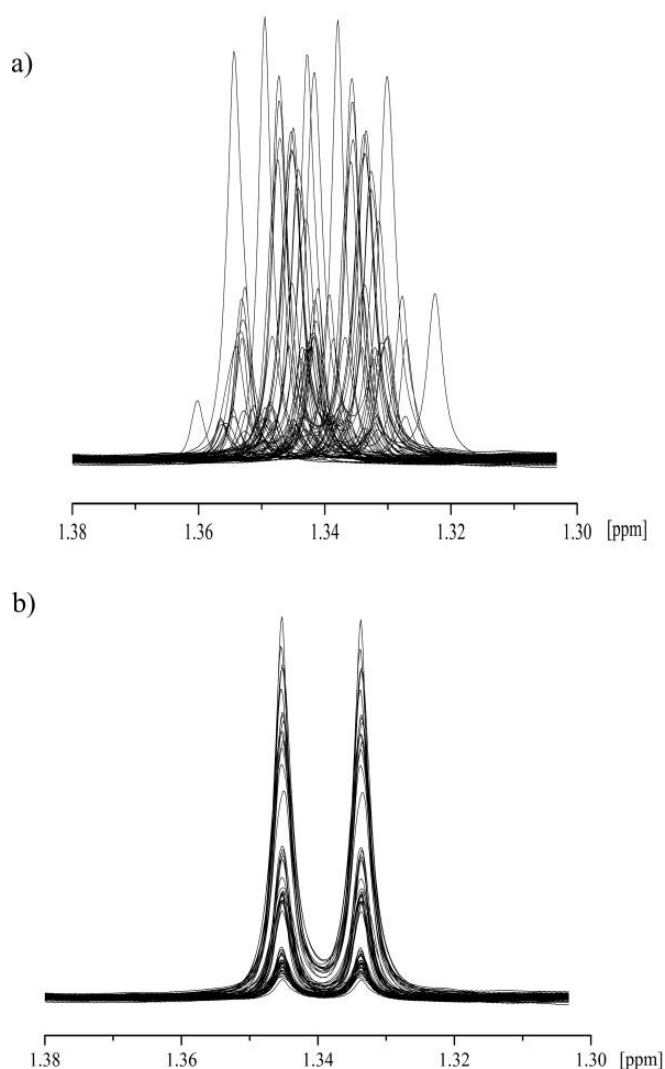
Número	Composto químico	δ ^1H [ppm]
1	álcoois	0,88
2	ácido láctico	1,34
3	alanina	1,45
4	ácido acético	2,04
5	ácido pirúvico	2,35
6	ácido succínico	2,57

Para obter estes resultados, foi necessário um procedimento de alinhamento espectral para redução de pequenas variações nas posições de pico dos compostos orgânicos, evitando interpretações errôneas. O procedimento de alinhamento

escolhido foi o método RSPA, que visa reorganizar os sinais espectroscópicos de compostos químicos idênticos, de forma que ocupem as mesmas posições de ressonância em múltiplos espectros, baseados em um espectro de referência. (MACKINNON *et al.*, 2012; VESELKOV *et al.*, 2009).

A Figura 29 a, b mostra os espectros de RMN de ^1H obtidos antes e após o procedimento de alinhamento, para a posição de ressonância (δ 1,34 ppm) correspondente ao ácido láctico.

Figura 29- - Ilustração do procedimento de alinhamento espectral. a) sinal em 1,34 ppm antes do alinhamento e b) sinal em 1,34 ppm após o alinhamento.



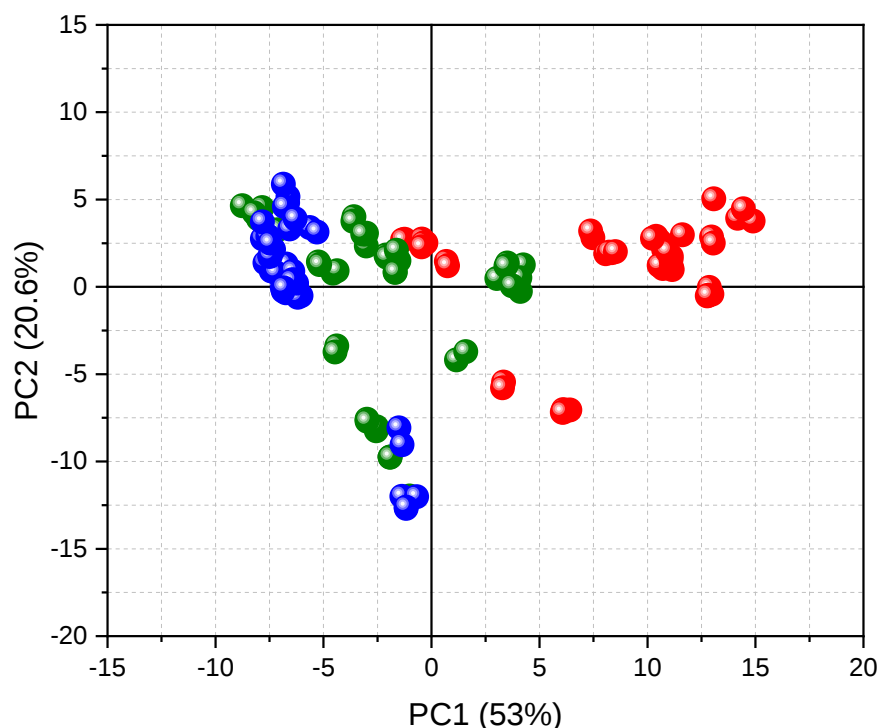
Fonte: (DA SILVA; FLUMIGNAN; PEZZA; *et al.*, 2019)

Neste estudo, o primeiro passo foi usar como o método não supervisionado mais eficaz para realizar análises exploratórias. A PCA foi aplicada a 126 amostras

de cervejas lager American Standard para diferentes regiões do espectro de RMN de ^1H , bem como para o espectro completo.

O gráfico de escores do espectro completo é mostrado na Figura 30, com os primeiros dois componentes principais explicando 73,6% da variância total. Os resultados obtidos mostram que não existe uma boa separação entre os grupos.

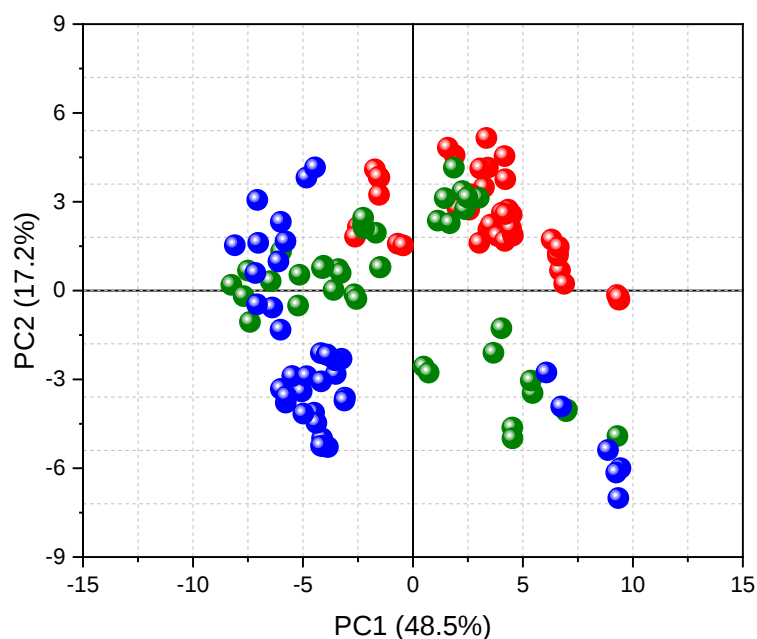
Figura 30- Gráfico de escores de PCA para todo o espectro (δ 0,0 a 9,0 ppm). PC1 x PC2 das amostras de cerveja lager. ● Esferas azuis: Ambev; ● Esferas verdes: Heineken; ● Esferas vermelhos: Grupo Petrópolis.



Fonte: (DA SILVA; FLUMIGNAN; PEZZA; *et al.*, 2019)

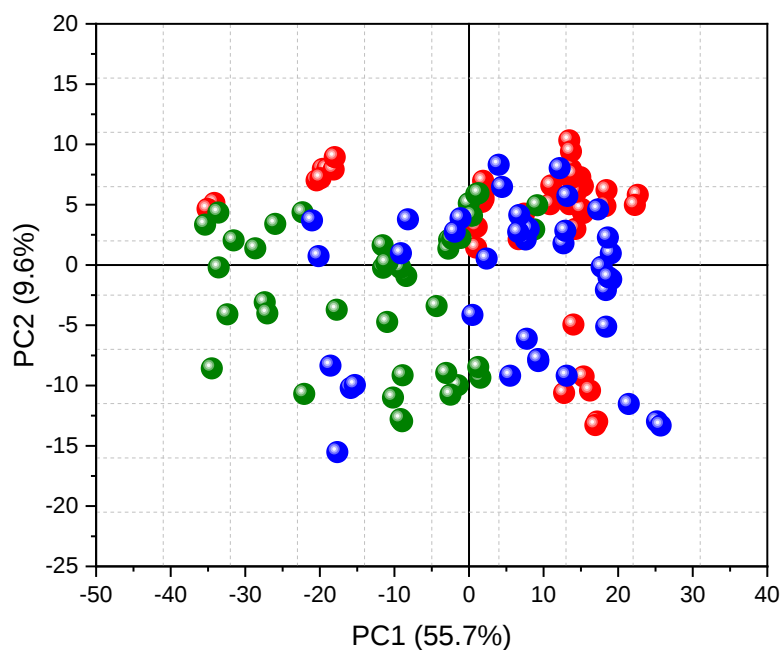
A Figura 31 e Figura 32 mostram os gráficos de escores para regiões de açúcares e compostos aromáticos, com a variância explicada pelos dois primeiros componentes principais, 65,7% e 65,2%, respectivamente. Como pode ser visto, não há uma separação clara entre os grupos. Os resultados podem ter sido limitados pela extensa sobreposição de deslocamento químico nessas regiões devido à complexidade das amostras.

Figura 31- Gráfico de escores de PCA para a região de açúcar (δ 3,0 a 6,0 ppm). PC1 x PC2 das amostras de cerveja lager. ● Esferas azuis: Ambev; ● Esferas verdes: Heineken; ● Esferas vermelhos: Grupo Petrópolis.



Fonte: (DA SILVA; FLUMIGNAN; PEZZA; *et al.*, 2019)

Figura 32- Gráfico de escores de PCA para a região do composto aromático (δ 6,0 a 9,0 ppm). PC1 x PC2 das amostras de cerveja lager. ● Esferas azuis: Ambev; ● Esferas verdes: Heineken; ● Esferas vermelhos: Grupo Petrópolis.

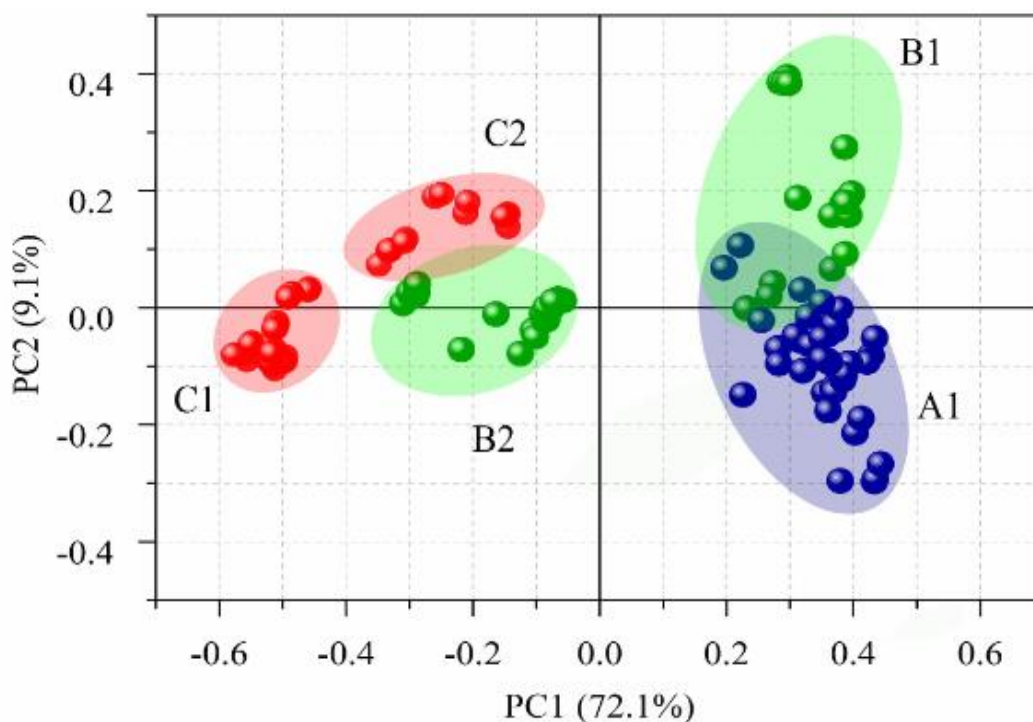


Fonte: (DA SILVA; FLUMIGNAN; PEZZA; *et al.*, 2019)

A Análise de Componentes Principais foi empregada para a técnica de reconhecimento de padrões. O gráfico de escores para as amostras de cerveja

mostrado na Figura 33, com os dois primeiros componentes principais explicando 81,2% da variância total. Foi observado que há uma clara tendência de agrupamento entre o conjunto de amostras produzidas pelas mesmas cervejarias.

Figura 33- Gráfico de scores da PCA para região dos compostos alifáticos. ● Esferas azuis: Ambev; ● Esferas verdes: Heineken; ● Esferas vermelhos: Grupo Petrópolis



Fonte: (DA SILVA; FLUMIGNAN; PEZZA; *et al.*, 2019)

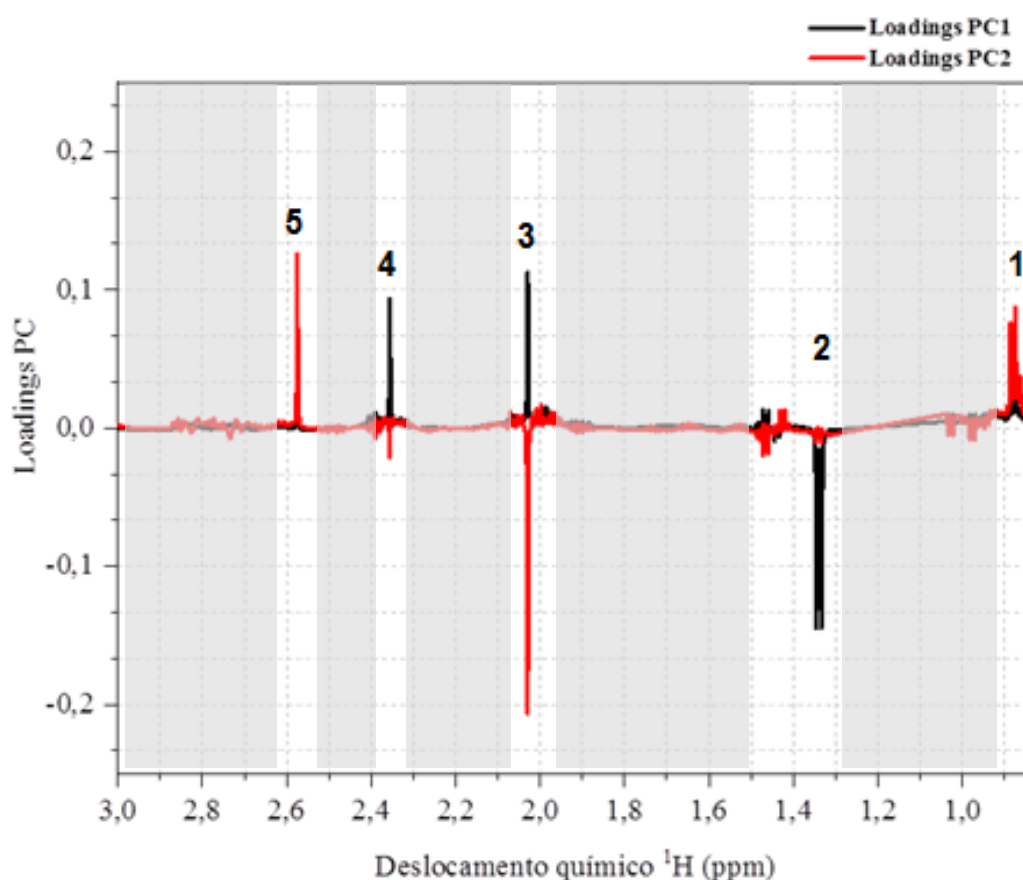
A Figura 34 mostra os loadings (pesos) para os dois primeiros componentes principais, destacando cinco posições de ressonância correspondentes aos sinais de ácidos orgânicos responsáveis pela separação dos grupos. Através da análise exploratória obtida pela PCA foi possível observar a formação de 5 grupos, sendo nomeados com as letras A, B e C.

O grupo A1, correspondente às amostras da cervejaria Ambev, na região positiva em PC1 e na região negativa em PC2. Isto provavelmente devido à presença de ácido acético (posição 3) e ácido pirúvico (posição 4) em maiores quantidades, em relação às outras cervejas. Os grupos B1 e B2 representam as cervejas da Heineken. Apesar de ser fabricado pela mesma empresa, havia uma diferença entre as marcas escolhidas neste estudo.

O grupo B1 nas regiões positivas em PC1 e PC2, enquanto B2 encontra-se na região negativa em PC1 e próximo à origem em PC2. A pequena diferença entre

as marcas pode ser atribuída principalmente ao conteúdo relativo de ácido succínico (posição 5) e álcoois (posição 1) nas amostras B1 e ácido acético (posição 3) nas amostras B2.

Figura 34- Gráfico de loadings das componentes principais PC1 e PC2. 1- álcoois, 2- ácido lático, 3- alanina, 4- ácido acético e 5- ácido pirúvico. Regiões destacadas são desconsideradas através de seleção de variáveis.



Fonte: (DA SILVA; FLUMIGNAN; PEZZA; *et al.*, 2019)

No geral, houve uma clara tendência de separação entre os clusters A1, B2, C1 e C2. Isto foi confirmado pela construção de modelos supervisionados (PLS-DA e SIMCA) que permitiram a discriminação e classificação das amostras de cerveja de acordo com a empresa responsável pela fabricação de cada uma das marcas analisadas.

O modelo PLS-DA foi construído com 3 classes (Ambev, Heineken e Grupo Petrópolis) e foi validado utilizando o procedimento validação cruzada. Os conjuntos de treinamento e teste foram definidos utilizando-se o algoritmo Kennard-Stone para

as amostras de cada marca de cerveja isoladamente. Essa etapa selecionou os espectros médios de 29 amostras para o conjunto de treinamento e de 13 para o conjunto de teste para cada uma das classes.

O número de variáveis latentes foi escolhido considerando os menores erros de classificação de validação cruzada, com pré-processamento e transformação matemática por centralização de média, normalização e suavização. Os resultados do PLS-DA revelaram taxas de classificação corretas de 94,2% para o conjunto de calibração e de 93,2% para o conjunto de previsão.

Tabela 9- As atribuições de classe obtidas com o modelo PLS-DA

Método	Conjunto	Classes	Classificada como				
			nº amostras	Ambev	Heineken	G.Petrópolis	NA*
PLS-DA	Treinamento	Ambev	29	27	0	0	2
		Heineken	29	0	27	0	2
		G.Petrópolis	29	0	1	28	0
	Previsão	Ambev	13	13	0	0	0
		Heineken	13	0	13	0	0
		G.Petrópolis	13	0	3	10	0

NA* não assinalada

Para o modelo SIMCA, adotou-se a mesma estratégia multiclases adotada para o PLS-DA, juntamente com as transformações pré-processuais e matemáticas, e selecionou-se o número de componentes principais baseado no menor valor do erro quadrático médio da validação cruzada apresentados na Tabela 10.

Tabela 10- As atribuições de classe obtidas com o modelo SIMCA

Método	Conjunto	Classes	Classificada como				
			nº amostras	Ambev	Heineken	G.Petrópolis	NA*
SIMCA	Treinamento	Ambev	29	22	4	3	0
		Heineken	29	0	28	1	0
		G.Petrópolis	29	2	0	27	0
	Previsão	Ambev	13	13	0	0	0
		Heineken	13	1	12	0	0
		G.Petrópolis	13	0	0	13	0

NA* não assinalada

A qualidade da classificação e discriminação foi avaliada através das figuras de mérito (sensibilidade, especificidade e precisão). A sensibilidade, especificidade e precisão foram determinadas da seguinte forma:

$$\text{Sensibilidade} = VP / (VP + FN) \quad (1)$$

$$\text{Especificidade} = VN / (VN + FN) \quad (2)$$

$$\text{Precisão} = (VN + VP) / (VN + VP + FN + FP) \quad (3)$$

onde VP, FN, VN, FP indicam os números de verdadeiros positivos, falsos negativos, verdadeiros negativos e falsos positivos respectivamente.

Os resultados da classificação para esses dois métodos em termos de sensibilidade e especificidade estão resumidos na Tabela 11. O SIMCA apresentou as melhores previsões, uma vez que a sensibilidade e a especificidade do conjunto de treinamento foram superiores a 92%.

Quanto aos resultados do PLS-DA, não podem ser considerados satisfatórios, principalmente no que se refere à sensibilidade, uma vez que um percentual significativo das amostras do Grupo Petrópolis foi predito como pertencente a outra cervejaria, podendo estar associado a fatores geográficos, matéria-prima e processos cervejeiros.

Tabela 11 - Sensibilidade e Especificidade para os modelos PLS-DA SIMCA

Método	Classes (Cervejarias)	Treinamento		Previsão	
		Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
PLS-DA	Ambev	93,1	94,8	100	88,5
	Heineken	93,1	94,8	100	88,5
	G.Petrópolis	96,6	93,1	76,9	100
SIMCA	Ambev	75,9	94,8	100	96,1
	Heineken	96,6	84,5	92,3	100
	G.Petrópolis	93,1	86,2	100	96,1

PLS-DA e SIMCA são amplamente empregados em termos de autenticidade de bebidas e alimentos. Os resultados são confiáveis, embora seja difícil compará-los porque os objetivos dos modelos são completamente diferentes. SIMCA é um método de classificação capaz de descrever uma classe de objeto de destino e então prever se um novo objeto se parece com esta classe ou não.

Por outro lado, o PLS-DA permite que dois ou mais conjuntos de objetos representem classes predefinidas e posteriormente avalia se um novo objeto se encaixa em pelo menos uma dessas classes.

Normalmente, os fatores que fornecem um incremento de sensibilidade determinam uma diminuição da especificidade e vice-versa. Dependendo do problema particular em estudo, pode ser preferível maximizar um dos dois parâmetros. Não raro, os modelos para autenticação de produtos alimentícios devem ter 100% de sensibilidade para garantir que produtos sejam aprovados como genuínos (GRANATO *et al.*, 2018).

Quando a especificidade é usada para otimizar um modelo de classe deve-se considerar que a escolha do modelo ótimo será parcialmente influenciada por informações de classes estranhas à modelada.

A abordagem multiclasse é a escolha adequada quando o interesse principal é investigar a possível adulteração nas amostras. Fornece informações mais específicas, pois além do percentual de amostras atribuídas correta ou incorretamente, também estão disponíveis informações relacionadas às atribuições inconclusivas (PALMIOLI *et al.*, 2020).

As amostras classificadas de forma inconclusiva podem ser submetidas na sequência para análises confirmatórias. Dentre os modelos multiclasse, o SIMCA também apresentou o melhor desempenho, sem predições de falso-negativo, ou seja, nenhuma amostra adulterada foi classificada como não adulterada em duas de três classes.

Do ponto de vista quantitativo, há consideravelmente pouca literatura sobre a autenticação de cerveja, especialmente cervejas brasileiras. Por esta razão, é de suma importância que sejam desenvolvidas metodologias analíticas eficazes que auxiliem os órgãos competentes a fiscalizar e garantir a qualidade da bebida. Além disso, preservar os direitos dos produtores e consumidores simultaneamente.

Os resultados sugerem o potencial da espectroscopia de RMN de ^1H combinado com ferramentas quimiométricas para a análise de cerveja e a discriminação de diferentes procedimentos de produção e características da bebida.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na primeira abordagem demonstraram que as análises de RMN de ^1H combinadas com quimiometria, pode ser muito útil quando aplicada a um conjunto adequado de amostras, fornecendo informações rápidas e confiáveis sobre a composição da cerveja, considerando os principais carboidratos e ácidos orgânicos e outros compostos químicos minoritários.

Os resultados mostraram que foi possível discriminar entre cervejas do mesmo tipo, porém de estilo diferente, utilizando uma abordagem simples, sem necessidade de algoritmos de pré-processamento ou operações de binning, focando apenas a atenção na região de carboidratos no espectro de RMN de ^1H . Essa abordagem poderia ser usada em outros estudos de triagem, por exemplo, para identificar e quantificar os açúcares derivados de adjuntos, e poderia ser estendida a outros compostos em diferentes regiões do espectro.

No entanto, na segunda abordagem a classificação e discriminação de amostras de cerveja do mesmo tipo e estilo necessitou a utilização de artifícios mais sofisticados, como uso de algoritmo de alinhamento espectral, tendo em vista que a região ressonante de interesse apresentou pequenas variações dos sinais de ressonância dos compostos químicos que permitiram diferenciá-las entre si e também entre os fabricantes.

No geral, os resultados obtidos através da combinação dos dados espectroscópicos com análise multivariada mostraram que é possível desenvolver novas metodologias eficazes para identificar amostras de cervejas através de análise rápida, confiável e reprodutiva.

6 REFERÊNCIAS

A. BLANCO, C. *et al.* Sensory Characterization of Commercial Lager Beers and Their Correlations with Iso- α -Acid Concentrations. *Journal of Food and Nutrition Research*, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2014.

ALMEIDA, C. *et al.* Composition of beer by ^1H NMR spectroscopy: Effects of brewing site and date of production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 3, p. 700–706, 2006.

AYABE, T. *et al.* Iso- α -acids, bitter components of beer, prevent obesity-induced cognitive decline. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2018.

Anuário da cerveja. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/anuario-da-cerveja-2019/>.

Acesso: 25 de fev. 2021.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). AOAC Official Methods of analysis. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Washington: AOAC, 2012.

BAMFORTH, C.W. *Progress in Brewing Science and Beer Production*. v. 8. 2017.

BAMFORTH, CHARLES W. Nutritional aspects of beer — a review. *Nutrition Research*, v. 22, p. 227–237, 2002.

BLANCO, C. A.; NIMUBONA, D.; CABALLERO, I. Prediction of the ageing of commercial lager beer during storage based on the degradation of iso- α -acids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 94, n. 10, p. 1988–1993, 2014.

BOGDAN, P.; KORDIALIK-BOGACKA, E. Alternatives to malt in brewing. *Trends in Food Science and Technology*, v. 65, p. 1–9, 2017.

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 77, n. 2, p. 157–172, 2013.

BOULTON, C. *Encyclopaedia of brewing*. First Edit. John Wiley & Sons, Ltd., 2013.

BRERETON, R. G. A short history of chemometrics: a personal view. n. May, p. 749–760, 2014.

BRERETON, R. G. Pattern recognition in chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 149, p. 90–96, 2015.

CABALLERO, I.; BLANCO, C. A.; PORRAS, M. Iso- α -acids, bitterness and

loss of beer quality during storage. *Trends in Food Science and Technology*, v. 26, n. 1, p. 21–30, 2012.

CAVALLINI, N. *et al.* Fused adjacency matrices to enhance information extraction: The beer benchmark. *Analytica Chimica Acta*, v. 1061, p. 70–83, 2019.

CONSONNI, R.; BERNAREGGI, F.; CAGLIANI, L. R. NMR-based metabolomic approach to differentiate organic and conventional Italian honey. *Food Control*, v. 98, n. August 2018, p. 133–140, 2018.

COOPER, C. M. *et al.* Comparison of the impact on the performance of small-scale mashing with different proportions of unmalted barley, Onda Pro®, malt and rice. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 122, n. 2, p. 218–227, 2016.

COOTE, N.; KIRSOP, B. H. the Content of Some Organic Acids in Beer and Other Fermented Media. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 80, n. 5, p. 474–483, 1974.

DA SILVA, L. A.; FLUMIGNAN, D. L.; PEZZA, H. R.; *et al.* ^1H NMR spectroscopy combined with multivariate data analysis for differentiation of Brazilian lager beer according to brewery. *European Food Research and Technology*, v. 245, p. 1–8, 2019.

DA SILVA, L. A.; FLUMIGNAN, D. L.; TININIS, A. G.; *et al.* Discrimination of Brazilian lager beer by ^1H NMR spectroscopy combined with chemometrics. *Food Chemistry*, v. 272, p. 488–493, 2019.

DAL POGGETTO, G. *et al.* Relaxation-encoded NMR experiments for mixture analysis: REST and beer. *Chemical Communications*, v. 53, n. 54, p. 7461–7464, 2017.

DAL POGGETTO, GUILHERME *et al.* Dissect and Divide: Putting NMR Spectra of Mixtures under the Knife. *Journal of the American Chemical Society*, v. 141, n. 14, p. 5766–5771, 2019.

DE ALMEIDA, N. E. C.; DO NASCIMENTO, E. S. P.; CARDOSO, D. R. On the reaction of lupulones, hops β -acids, with 1-hydroxyethyl radical. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 42, p. 10649–10656, 2012.

DICAPRIO, A.; EDWARDS, J. Application of quantitative nuclear magnetic resonance spectroscopy to biological acidification of barley mashes. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 120, n. 3, p. 207–211, 2014.

DIGHE, R. S. A taste for temperance: how American beer got to be so bland. *Business History*, v. 58, n. 5, p. 752–784, 2016.

DONADINI, G.; FUMI, M. D.; NEWBY-CLARK, I. R. Consumers' preference and sensory profile of bottom fermented red beers of the Italian market. *Food Research International*, v. 58, p. 69–80, 2014.

DUARTE, I. *et al.* High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 9, p. 2475–2481, 2002.

DUARTE, I. F. *et al.* Multivariate analysis of NMR and FTIR data as a potential tool for the quality control of beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. August 2015, p. 1031–1038, 2004.

FAN, S. *et al.* Classification of Chinese wine varieties using ^1H NMR spectroscopy combined with multivariate statistical analysis. *Food Control*, v. 88, p. 113–122, 2018.

FERREIRA, I. *et al.* Effects of the combination of hydrophobic polypeptides, iso-alpha acids, and malto-oligosaccharides on beer foam stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 12, p. 4976–4981, 2005.

FORINA, M. *et al.* Class-modeling techniques, classic and new, for old and new problems. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 93, n. 2, p. 132–148, 2008.

GEISLER, A. J. *et al.* Metabolic strategies of beer spoilage lactic acid bacteria in beer. *International Journal of Food Microbiology*, v. 216, p. 60–68, 2016.

GLATTHAR, J.; HEINISCH, J. J.; SENN, T. Unmalted triticale cultivars as brewing adjuncts: Effects of enzyme activities and composition on beer wort quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 85, n. 4, p. 647–654, 2005.

GRANATO, D. *et al.* Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, n. 3, p. 563–571, 2011.

GRANATO, D. *et al.* Trends in Chemometrics: Food Authentication, Microbiology, and Effects of Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 17, n. 3, p. 663–677, 2018.

HASELEU, G.; INTELMAH, D.; HOFMANN, T. Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from β -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling. *Food Chemistry*, v. 116, n. 1, p. 71–81, 2009.

HATZAKIS, E. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and*

Food Safety, v. 18, n. 1, p. 189–220, 2019.

HEUBERGER, A. L. *et al.* Metabolomic profiling of beer reveals effect of temperature on non-volatile small molecules during short-term storage. *Food Chemistry*, v. 135, n. 3, p. 1284–1289, 2012.

HOLMES, C. P.; CASEY, J.; COOK, D. J. Mashing with unmalted sorghum using a novel low temperature enzyme system: Impacts of sorghum grain composition and microstructure. *Food Chemistry*, v. 221, p. 324–334, 2017.

HORNSEY, I. S. A History of beer and brewing. In: CHEMISTRY, T. R. S. (Org.), 2003. p. 1–761.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - INMETRO. - “Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos”. DOQ-CGCRE-008, Rio de Janeiro, 2011. Revisão 04, 20p.

ISAAC-LAM, M. F. Determination of Alcohol Content in Alcoholic Beverages Using 45 MHz Benchtop NMR Spectrometer. *International Journal of Spectroscopy*, v. 2016, p. 1–8, 2016.

IZABEL, M. *et al.* Authentication of roasted and ground coffee samples containing multiple adulterants using NMR and a chemometric approach. *Food Control*, v. 112, n. January, p. 107104, 2020.

JEONG, J. H.; CHO, S. J.; KIM, Y. High-Resolution NMR Spectroscopy for the Classification of Beer. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, v. 38, n. 4, p. 466–470, 2017.

JOHNSON, S. *et al.* Nuclear Magnetic Resonance and Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography as Complementary Methods for the Analysis of Beer Samples. *Beverages*, v. 3, n. 2, p. 21, 2017.

KENNARD, A. R. W.; STONE, L. A. Computer Aided Design of Experiments. *Technometrics*, v. 11, n. 1, p. 137–148, 1969.

KUBALLA, T. *et al.* Application of NMR for authentication of honey, beer and spices. *Current Opinion in Food Science*, v. 19, p. 57–62, 2018.

KUNZE, W.; MANGER, H. J.; PRATT, S. *Technology Brewing & Malting*. 5th Revised ed. Berlin, 2014.

LACHENMEIER, D. W. *et al.* Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. *European Food Research and Technology*, v. 220, n. 2, p. 215–221, 2005.

LI, H. *et al.* Study on the buffering capacity of wort. *Journal of the Institute of*

Brewing, v. 122, n. 1, p. 138–142, 2016.

LID, P. P.; PLANNING, S. *PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS (PCA)*. v. 19. 1993.

LIU, C. *et al.* Influencing factors of hydrogen bonding intensity in beer. *Journal of Food Science and Technology*, v. 51, n. 11, p. 2964–2976, 2012.

LODOLO, E. J. *et al.* The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, v. 8, n. 7, p. 1018–1036, 2008.

MACKINNON, N. *et al.* Variable reference alignment: An improved peak alignment protocol for NMR spectral data with large intersample variation. *Analytical Chemistry*, v. 84, n. 12, p. 5372–5379, 2012.

MAIAW, C. S. W. *et al.* Detection of adulterants in grape nectars by attenuated total reflectance Fourier-transform mid-infrared spectroscopy and multivariate classification strategies. *Food Chemistry*, v. 266, n. May, p. 254–261, 2018.

MONAKHOVA, Y. B. *et al.* Application of automated eightfold suppression of water and ethanol signals in ^1H NMR to provide sensitivity for analyzing alcoholic beverages. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 49, n. 11, p. 734–739, 2011.

NOBIS, A. *et al.* Formation of 3-deoxyglucosone in the malting process. *Food Chemistry*, v. 290, n. March, p. 187–195, 2019.

OLADOKUN, O. *et al.* Perceived bitterness character of beer in relation to hop variety and the impact of hop aroma. *Food Chemistry*, v. 230, p. 215–224, 2017.

OLIVERI, P.; SIMONETTI, R. Chemometrics for Food Authenticity Applications. *Advances in Food Authenticity Testing*. Elsevier Ltd, 2016. p. 701–728.

OLIVERI, PAOLO; DOWNEY, G. Multivariate class modeling for the verification of food-authenticity claims. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 35, p. 74–86, 2012.

OLIVIERI, A. C. *Introduction to Multivariate Calibration: A Practical Approach*. v.2 233-254, 2018.

PALMIOLI, A. *et al.* Metabolomic profiling of beers: Combining ^1H NMR spectroscopy and chemometric approaches to discriminate craft and industrial products. *Food Chemistry*, v. 327, n. April, p. 127025, 2020.

PAVIA, D. L. *et al.* Introdução à espectroscopia 4. 2010.

PEREIRA, H. V. *et al.* Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers. *Analytica Chimica Acta*, v. 940, p. 104–112, 2016.

PETERSEN, BENT O., MATHIAS NILSSON, M. B. ^1H NMR spectroscopy for profiling complex carbohydrate mixtures. *Food Chemistry*, v. 150, p. 65–72, 2014.

PETERSEN, B. O.; MEIER, S.; DUUS, J. O. NMR assignment of structural motifs in intact β -limit dextrin and its α -amylase degradation products in situ. *Carbohydrate Research*, v. 359, p. 76–80, 2012.

PIRES, E. J. *et al.* Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 98, n. 5, p. 1937–1949, 2014.

POMERANTSEV, A. L.; RODIONOVA, O. Y. Multiclass partial least squares discriminant analysis: Taking the right way-A critical tutorial. *Journal of Chemometrics*, n. January, p. e3030, 2018.

POREDA, A. *et al.* Corn grist adjunct - application and influence on the brewing process and beer quality. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 120, n. 1, p. 77–81, 2014.

SÁNCHEZ-ESTÉBANEZ, C. *et al.* Nuclear Magnetic Resonance Methodology for the Analysis of Regular and Non-Alcoholic Lager Beers. *Food Analytical Methods*, v. 11, n. 1, p. 11–22, 2018.

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

SCHIEVANO, E.; TONOLI, M.; RASTRELLI, F. NMR Quantification of Carbohydrates in Complex Mixtures. A Challenge on Honey. *Analytical Chemistry*, v. 89, n. 24, p. 13405–13414, 2017.

ŠEDO, O.; MÁROVÁ, I.; ZDRÁHAL, Z. Beer fingerprinting by Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation-Time of Flight Mass Spectrometry. *Food Chemistry*. 23–28, 2012

SILVERSTEIN, R. M. & WEBSTER, F. X. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, 6a edição, LTC, 2000.

SPEVACEK, A. R. *et al.* Beer metabolomics: Molecular details of the brewing process and the differential effects of late and dry hopping on yeast purine metabolism. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 122, n. 1, p. 21–28, 2016.

SPRENG, S.; HOFMANN, T. Activity-Guided Identification of in Vitro Antioxidants in Beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 66, n. 3, p. 720–731, 2018.

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

TOCI, A. T. *et al.* Fingerprint and authenticity roasted coffees by ^1H -NMR: the Brazilian coffee case. *Food Science and Biotechnology*, v. 27, n. 1, p. 19–26, 2018.

VAN DONKELAAR, L. H. G. *et al.* Combining unmalted barley and pearling gives good quality brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 122, n. 2, p. 228–236, 2016.

VESELKOV, K. A. *et al.* Recursive segment-wise peak alignment of biological ^1H NMR spectra for improved metabolic biomarker recovery. *Analytical Chemistry*, v. 81, n. 1, p. 56–66, 2009.

VOGELS, J. T. W. E. *et al.* Detection of Adulteration in Orange Juices by a New Screening Method Using Proton NMR Spectroscopy in Combination with Pattern Recognition Techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, n. 1, p. 175–180, 1996.

WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeast during fermentation of alcoholic beverages - A Review. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 82, p. 84–92, 1976.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELATDI, P. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 2, n. 1–3, p. 37–52, 1987.

ZHUANG, S. *et al.* Brewing with 100 % unmalted grains: barley, wheat, oat and rye. *European Food Research and Technology*, v. 243, n. 3, p. 447–454, 2017.