

MSC

2.<sup>o</sup>  
CICLO

FCUP  
2020

U.  
PORTO

Implementação e Validação de um método de  
quantificação de ácidos  $\alpha$ , ácidos  $\beta$  e humulinonas  
por HPLC

Sarah Anna Gonçalves de Magalhães

FC

U.  
PORTO  
FC FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO

# Implementação e Validação de um método de quantificação de ácidos $\alpha$ , ácidos $\beta$ e humulinonas por HPLC

Sarah Anna Gonçalves de Magalhães

Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química

Departamento de Química e Bioquímica, FCUP

2020

**Orientador**

Luís Guilherme de Lima Ferreira Guido, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

**Coorientador**

Fábio Oliveira, Coordenador de Laboratório Central, *Super Bock Group*

U.  
PORTO  
FC FACULDADE DE CIÊNCIAS  
UNIVERSIDADE DO PORTO

M

S

C

M

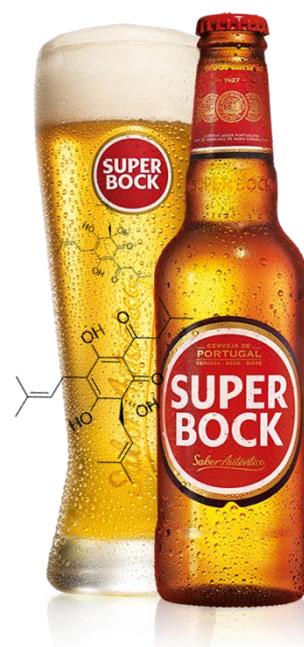
S

C

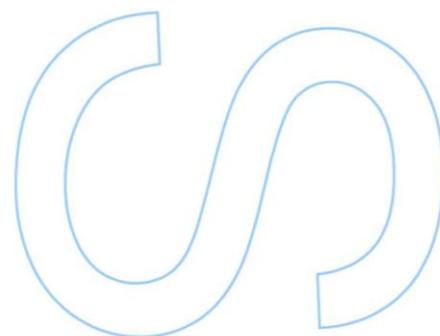
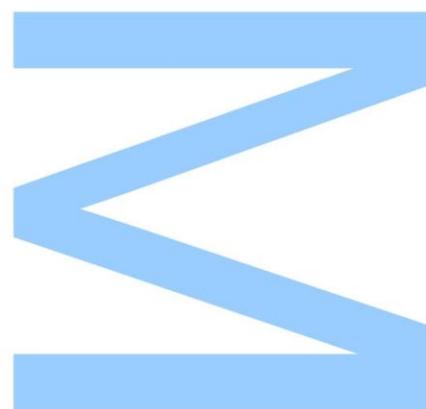
M

S

C



# Implementação e Validação de um método de quantificação de ácidos $\alpha$ , ácidos $\beta$ e humulinonas por HPLC



Sarah Anna Gonçalves de Magalhães

Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química

Departamento de Química e Bioquímica, FCUP

2020

## Orientador

Luís Guilherme de Lima Ferreira Guido, Professor Auxiliar, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

## Coorientador

Fábio Oliveira, Coordenador de Laboratório Central, *Super Bock Group*

Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas.

O Presidente do Júri,

Porto, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**N**

S

R

# Resumo

A cerveja é uma bebida popular que se encontra presente na cultura humana há inúmeros séculos. Uma das matérias-primas mais importantes para a produção de cerveja é o lúpulo, o composto responsável pelo amargor e pela conservação da mesma. Alguns compostos químicos presentes no lúpulo, e responsáveis por esse amargor são, os ácidos  $\alpha$ , os ácidos  $\beta$  e as humulinonas. As humulinonas provêm da oxidação de ácidos  $\alpha$  quando usada a técnica de lupulagem denominada por *dry-hopping*.

Com o aparecimento de novas técnicas de lupulagem tornou-se necessário quantificar os compostos do lúpulo de forma a garantir a qualidade e o sabor das diferentes cervejas. Os ácidos  $\alpha$ , os ácidos  $\beta$  e as humulinonas são determinados recorrendo à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) sendo esta a técnica que permite uma melhor separação e quantificação destes compostos e dos respetivos isómeros.

O presente estágio foi realizado nas instalações da *Super Bock Group* no âmbito da unidade curricular estágio do Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análises Químicas. O objetivo do estágio consistia em verificar se o método usado para a quantificação de ácidos  $\alpha$  e ácidos  $\beta$  também permitia a quantificação de humulinonas e xantohumol. Numa primeira fase do projeto verificou-se que o método apresentava um erro técnico que consistia no aparecimento de uma lomba na linha de base que não permitia a quantificação correta dos compostos de interesse. Procedeu-se à reparação e manutenção do equipamento não se tendo verificado qualquer melhoria. De forma a prosseguir com o trabalho, e resolver o problema, a solução encontrada foi a alteração do gradiente da fase móvel do método. Como o método sofreu alterações tornou-se necessário realizar novamente os testes de validação para os ácidos  $\alpha$  e para os ácidos  $\beta$  e apenas foi possível verificar a eficiência deste método para as humulinonas.

A validação do método não foi concluída uma vez que apenas foi possível apresentar as retas de calibração, a sensibilidade, os limiares analíticos e a reprodutibilidade de uma amostra. Através da observação dos limites de quantificação (*LQ*) foi verificado que as humulinonas não podem ser quantificadas recorrendo ao mesmo método usado para ácidos  $\alpha$  e ácidos  $\beta$  visto que o limite de quantificação (*LQ*) foi superior à concentração do primeiro padrão da gama de trabalho (*P1*).

O método apresentou repetibilidade para a quantificação de ácidos  $\alpha$  em cervejas *Super Bock*, porém, o valor do coeficiente de variação (*CV*) foi ligeiramente superior ao valor estabelecido (>10%).

# Abstract

Beer is a popular drink that has been present in human culture for many centuries. One of the most important raw materials for beer production is hops, the compound responsible for bitterness and its conservation. Some chemical compounds present in the hops and responsible for this bitterness are  $\alpha$  acids,  $\beta$  acids and humulinones. Humulinones come from the oxidation of  $\alpha$  acids when using the hopping technique called dry-hopping.

With the emergence of new hopping techniques, it has become necessary to quantify the hop compounds to guarantee the quality and flavor of the different products.  $\alpha$  acids,  $\beta$  acids and humulinones are determined using high performance liquid chromatography (HPLC) as this technique allows better separation and quantification of these compounds and their isomers.

This internship was held at the *Super Bock Group* facilities within the scope of the internship course of the Master in Advanced Methods and Accreditation in Chemical Analysis. The objective of the internship was to verify if the method used for the quantification of  $\alpha$  and  $\beta$  acids also allowed the quantification of humulinones and xanthumum. In a first phase of the project, it was found that the method had a technical error that represented the appearance of a bump in the baseline that did not allow the correct quantification of the compounds of interest. The equipment was repaired and maintained, with no improvement. In order to continue the work and solve the problem, the solution found was to change the gradient of the mobile phase of the method. As the method underwent changes, it became necessary to perform the validation tests for  $\alpha$  acids and  $\beta$  acids again and it was only possible to verify the efficiency of this method for humulinones.

The validation of the method was not completed since it was only possible to present the calibration lines, the sensitivity, the analytical thresholds and the reproducibility of a sample. Through the observation of the limits of quantification (*LQ*) it was verified that humulinones cannot be quantified using the same method used for  $\alpha$  and  $\beta$  acids, since the limit of quantification (*LQ*) was higher than the concentration of the first standard of the working range. (*P1*).

The method showed repeatability for the quantification of  $\alpha$  acids in *Super Bock* beers, however, the coefficient of variation (*CV*) value was slightly higher than the established value (>10%).

# Agradecimentos

A concretização deste projeto é fruto de uma grande e duradoura aprendizagem, a despedida da vida académica e o começo de uma nova vida no mundo profissional. A sua realização não teria sido possível sem o contributo de inúmeras pessoas que, de uma forma ou de outra, permitiram que chegasse a este final de reta.

Em primeiro lugar agradeço ao Doutor Luis F. Guido, Professor Auxiliar na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, por toda a disponibilidade, paciência e orientação.

Em segundo ao Doutor Pedro Rodrigues, Diretor do Departamento de Qualidade da *Super Bock Group*, gostaria de agradecer pela receção, pela orientação e pela partilha de conhecimento.

Ao meu coorientador, Fábio Oliveira, agradeço por toda a paciência, preocupação e disponibilidade e pela destreza em encontrar soluções mesmo quando as coisas não corriam como previstas.

Ao Doutor Telmo Fernandes, por me ensinar tanto sobre a técnica, por demonstrar sempre a maior disponibilidade e pelo apoio incondicional.

E por fim, aos meus pais, agradeço pelo apoio moral e financeiro, por acreditarem sempre em mim e por me permitirem que realizasse mais um de tantos sonhos. Sem eles, este relatório de estágio não existiria e eu não seria o que sou hoje.

# Índice

## Capítulo I – Enquadramento do trabalho

1. A empresa.....	17
1.1 História.....	17
2. Enquadramento e apresentação do projeto.....	19
3. Organização do Relatório de Estágio.....	19

## Capítulo II – Introdução

1. Cerveja.....	22
1.1. Matérias primas.....	23
1.1.1. Água.....	23
1.1.2. Malte.....	24
1.1.3. Lúpulo.....	24
1.1.4. Leveduras.....	24
1.2. História da cerveja.....	25
1.3. Processo de produção de cerveja.....	26
1.3.1. Moagem.....	26
1.3.2. Empastagem.....	27
1.3.3. Filtração do mosto.....	27
1.3.4. Ebulição do mosto.....	27
1.3.5. Fermentação.....	28
1.3.6. Maturação.....	28
1.3.7. Segunda filtração.....	28
1.3.8. Acabamento.....	28
1.3.9. Armazenamento.....	29
2. Lúpulo.....	30
2.1. Composição química do lúpulo.....	30
2.1.1. Resinas totais.....	31
2.1.2. Resinas macias.....	32
2.1.2.1. Ácidos $\alpha$ .....	32
2.1.2.2. Ácidos $\beta$ .....	34
2.1.3. Humulinonas.....	35
2.2. Técnicas de lupulagem.....	36
2.2.1. Técnica tradicional.....	36
2.2.2. Lupulagem durante a empastagem – <i>Mash hopping</i> .....	36

2.2.3.	Lupulagem antes da ebulição e depois da filtração do mosto – <i>First wort hopping</i> .....	37
2.2.4.	Lupulagem tardia – <i>Late hopping</i> .....	37
2.2.5.	Lupulagem após a ebulição do mosto – <i>Whirlpool hopping</i> .....	37
2.2.6.	Lupulagem reversa – <i>Hop back</i> .....	37
2.2.7.	Lupulagem a frio – <i>Dry-hopping</i> .....	38
2.3.	Técnicas para a determinação de ácidos $\alpha$ , ácidos $\beta$ e humulinonas em cervejas.....	38
3.	Validação de métodos analíticos.....	39
3.1.	Identificação.....	40
3.2.	Especificidade e seletividade.....	40
3.3.	Gráfico analítico.....	40
3.4.	Sensibilidade.....	41
3.5.	Testes de linearidade.....	41
3.5.1.	Teste de Mandel.....	42
3.5.2.	Teste das áreas normalizadas.....	43
3.6.	Teste da gama analítica.....	44
3.7.	Limites analíticos.....	45
3.7.1.	Limite de deteção.....	45
3.7.2.	Limite de quantificação.....	46
3.8.	Precisão.....	46
3.8.1.	Repetibilidade.....	47
3.8.2.	Reprodutibilidade.....	48
3.8.3.	Precisão intermédia.....	49
3.9.	Robustez.....	49
3.10.	Teste de Grubbs para a avaliação numérica de dados não conciliáveis.....	50
3.10.1.	Observação de um resultado.....	50
3.10.2.	Observação de dois resultados.....	50
4.	Controlo químico de qualidade.....	52
4.1.	Sistema de controlo interno (SCI).....	52
4.1.1.	Calibração de equipamentos analíticos.....	52
4.1.2.	Análise de brancos.....	53
4.1.3.	Análise de duplicados.....	53
4.1.4.	Amostras cegas.....	53
4.1.5.	Cartas de controlo.....	53
4.1.6.	Ensaio de recuperação.....	54
4.2.	Sistema de controlo externo (SCE).....	55

4.2.1. Ensaio interlaboratoriais.....	55
4.2.2. Materiais de referência certificados.....	56

### Capítulo III – Parte experimental

1. Princípio do método .....	58
2. Reagentes e materiais utilizados.....	60
3. Preparação da fase móvel.....	61
4. Preparação das soluções padrão.....	62
5. Técnica.....	63
5.1. Condições cromatográficas.....	63
5.2. Preparação de amostras de cerveja .....	64

### Capítulo IV – Resultados e Discussão

1. Resolução do desvio na linha de base do cromatograma.....	66
2. Resultados da validação.....	68
2.1. Sensibilidade.....	68
2.2. Testes da linearidade da curva de calibração.....	69
2.2.1. ICS Hum-1.....	69
2.2.2. ICS-I4.....	71
2.2.3. ICS-T3.....	72
2.2.4. ICE-3.....	74
2.3. Testes da gama analítica.....	75
2.3.1. ICS Hum-1.....	76
2.3.2. ICS-I4.....	77
2.3.3. ICS-T3.....	78
2.3.4. ICE-3.....	79
2.4. Limite de deteção e limite de quantificação .....	79
2.5. Repetibilidade.....	81

### Capítulo V – Conclusão

Conclusão.....	84
----------------	----

### Capítulo VI – Referências Bibliográficas

Referências bibliográficas .....	87
----------------------------------	----

# Lista de abreviaturas

<b>SBG:</b>	Super Bock Group
<b>CUPF:</b>	Companhia União Fabril Portuense
<b>ASBC:</b>	American Society of Brewing Chemist
<b>VMPS:</b>	Vidago, Melgaço e Pedras Salgadas
<b>IUPAC:</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<b>TV:</b>	Valor Teste
<b>F<sub>crít.</sub>:</b>	Valor crítico de Fisher
<b>F:</b>	Teste de Fisher
<b>H<sub>0</sub>:</b>	Hipótese nula
<b>H<sub>1</sub>:</b>	Hipótese alternativa
<b>LD:</b>	Limite de deteção
<b>LQ:</b>	Limite de quantificação
<b>CV:</b>	Coeficiente de variação
<b>R<sub>L</sub>:</b>	Limite de repetibilidade
<b>DR:</b>	Diferença relativa
<b>LS:</b>	Limite de controlo superior
<b>LAS:</b>	Limite de aviso superior
<b>LC:</b>	Limite de controlo
<b>LAI:</b>	Limite de aviso inferior
<b>LI:</b>	Limite inferior
<b>Rec:</b>	Valor de recuperação
<b>GQ:</b>	Garantia de Qualidade
<b>CQ:</b>	Controlo de Qualidade
<b>SCI:</b>	Sistema de controlo interno

<b>SCE:</b>	Sistema de controlo externo
<b>DR:</b>	Diferença relativa
<b>Z-score:</b>	Valor do desempenho de um laboratório
<b>IMRC:</b>	Materiais de referência certificados
<b>NP:</b>	Norma Portuguesa
<b>t-test:</b>	Teste de hipóteses
<b>ICS Hum-1:</b>	Padrão com humulinonas
<b>ICS-I4:</b>	Padrão com iso- $\alpha$ -ácidos
<b>ICS-T3:</b>	Padrão com tetra-hidro-iso- $\alpha$ -ácidos
<b>ICE-3:</b>	Padrão com ácidos $\alpha$ e ácidos $\beta$
<b>HPLC:</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>R:</b>	Coeficiente de correlação
<b>m:</b>	Declive
<b>DS<sup>2</sup>:</b>	Valor da diferença de variância
<b>P01:</b>	Modelo de polinómio de grau 1
<b>P02:</b>	Modelo de polinómio de grau 2
<b>P1:</b>	Padrão da curva de calibração com menor concentração

# Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> – Logotipo da atual Super Bock Group.....	17
<b>Figura 2</b> – Instalações da Super Bock Group.....	18
<b>Figura 3</b> – Exemplo de apresentação da cerveja.....	22
<b>Figura 4</b> – Mosteiro de Weihenstephan, a cervejeira em funcionamento mais antiga do mundo .....	25
<b>Figura 5</b> – Exemplo ilustrativo de malte.....	26
<b>Figura 6</b> – Exemplo ilustrativo de mosto.....	27
<b>Figura 7</b> – Flores de lúpulo.....	30
<b>Figura 8</b> – Principais constituintes das resinas totais do lúpulo.....	32
<b>Figura 9</b> – Estrutura química dos principais ácidos $\alpha$ .....	33
<b>Figura 10</b> – Representação da isomerização da humulona cis/trans-iso-humulona.....	34
<b>Figura 11</b> – Estrutura química dos principais ácidos $\beta$ .....	35
<b>Figura 12</b> – Conversão das humulonas em humulinonas através de um mecanismo radicalar e na presença de luz.....	35
<b>Figura 13</b> – Cromatograma com todos os compostos responsáveis pelo amargor da cerveja (humulinonas, ácidos $\alpha$ e ácidos $\beta$ ).....	58
<b>Figura 14</b> – Injeção de água ultrapura com o método usado para analisar humulinonas. O esperado seria uma linha de base constante, mas, contrariamente, foi obtida uma lomba fantasma nos tempos de retenção entre 10 e 18 min.....	65
<b>Figura 15</b> – Representação gráfica dos sinais normalizados do padrão ICS Hum-1 para o teste das áreas normalizadas.....	69
<b>Figura 16</b> – Representação gráfica dos sinais normalizados do padrão ICS-I4 para o teste das áreas normalizadas.....	71
<b>Figura 17</b> - Representação gráfica dos sinais normalizados do padrão ICS-T3 para o teste das áreas normalizadas.....	72
<b>Figura 18</b> - Representação gráfica dos sinais normalizados do padrão ICE-3 para o teste das áreas normalizadas.....	74

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Principais constituintes químicos presentes no lúpulo com as respectivas quantidades .....	30
<b>Tabela 2</b> – Identificação dos padrões usados para validar o método de quantificação dos compostos responsáveis pelo amargor da cerveja.....	56
<b>Tabela 3</b> – Identificação de cada pico correspondente ao seu composto de origem no cromatograma.....	58
<b>Tabela 4</b> – Reagentes utilizados para a implementação do método de quantificação de ácidos $\alpha$ , ácidos $\beta$ e humulinonas por HPLC .....	59
<b>Tabela 5</b> – Padrões utilizados para a implementação do método de quantificação de ácidos $\alpha$ , ácidos $\beta$ e humulinonas por HPLC .....	59
<b>Tabela 6</b> – Materiais utilizados para a implementação do método de quantificação de ácidos $\alpha$ , ácidos $\beta$ e humulinonas por HPLC .....	59
<b>Tabela 7</b> – Volume necessário a retirar das respectivas soluções-mãe de modo a obter as diluições necessárias para as soluções-padrão .....	61
<b>Tabela 8</b> – Método para análise de humulinonas, ácidos $\alpha$ e ácidos $\beta$ .....	62
<b>Tabela 9</b> – Gradiente do método “ <i>Dosage des acides alfa, des acides iso-alpha et des acides tetra-hydro-iso alfa par HPLC</i> ” implementado pela cervejaria <i>Kronenbourg</i> .....	65
<b>Tabela 10</b> – Gama de trabalho dos respectivos padrões escolhidos para o presente projeto em mg-7/L.....	66
<b>Tabela 11</b> – Declive obtido para cada reta de calibração referente a cada padrão com o respetivo coeficiente de correlação e equação da reta de calibração .....	66
<b>Tabela 12</b> – Valores das variâncias da curva de calibração de grau 1 e da curva de calibração de grau 2 para o padrão ICS Hum-1.....	67
<b>Tabela 13</b> – Resultados do teste de Mandel para o padrão ICS Hum-1: o valor da diferença de variância, o valor teste e o valor tabelado da distribuição de Fisher.....	67
<b>Tabela 14</b> – Valores dos sinais analíticos normalizados para o padrão ICS Hum-1.....	68
<b>Tabela 15</b> – Valores das variâncias da curva de calibração de grau 1 e da curva de calibração de grau 2 para o padrão ICS-I4.....	69

<b>Tabela 16</b> – Resultados do teste de Mandel para o padrão ICS-I4: o valor da diferença de variância, o valor teste e o valor tabelado da distribuição de Fisher.....	69
<b>Tabela 17</b> – Valores dos sinais analíticos normalizados para o padrão ICS-I4.....	69
<b>Tabela 18</b> – Valores das variâncias da curva de calibração de grau 1 e da curva de calibração de grau 2 para o padrão ICS-T3.....	70
<b>Tabela 19</b> – Resultados do teste de Mandel para o padrão ICS-T3: o valor da diferença de variância, o valor teste e o valor tabelado da distribuição de Fisher.....	70
<b>Tabela 20</b> – Valores dos sinais analíticos normalizados para o padrão ICS-T3.....	71
<b>Tabela 21</b> – Valores das variâncias da curva de calibração de grau 1 e da curva de calibração de grau 2 para o padrão ICE-3.....	72
<b>Tabela 22</b> – Resultados do teste de Mandel para o padrão ICE-3: o valor da diferença de variância, o valor teste e o valor tabelado da distribuição de Fisher.....	72
<b>Tabela 23</b> – Valores dos sinais analíticos normalizados para o padrão ICE-3.....	72
<b>Tabela 24</b> – Resultados do teste da homogeneidade de variância obtido para o padrão ICS Hum-1. Foram realizadas 10 repetições independentes entre si. O valor usado para o cálculo representa a soma de todos os isômeros presentes no padrão.....	74
<b>Tabela 25</b> – Resultado do valor do teste de Fisher e do valor crítico de Fisher para o teste da homogeneidade de variância do padrão ICS Hum-1.....	74
<b>Tabela 26</b> – Resultados do teste da homogeneidade de variância obtido para o padrão ICS-I4. Foram realizadas 10 repetições independentes entre si. O valor usado para o cálculo representa a soma de todos os isômeros presentes no padrão.....	75
<b>Tabela 27</b> – Resultado do valor do teste de Fisher e do valor crítico de Fisher para o teste da homogeneidade de variância do padrão ICS-I4.....	75
<b>Tabela 28</b> – Resultados do teste da homogeneidade de variância obtido para o padrão ICS-T3. Foram realizadas 10 repetições independentes entre si. O valor usado para o cálculo representa a soma de todos os isômeros presentes no padrão.....	76
<b>Tabela 29</b> – Resultado do valor do teste de Fisher e do valor crítico de Fisher para o teste da homogeneidade de variância do padrão ICS-T3.....	76
<b>Tabela 30</b> – Resultados do teste da homogeneidade de variância obtido para o padrão ICE-3. Foram realizadas 10 repetições independentes entre si. O valor usado para o cálculo representa a soma de todos os isômeros presentes no padrão.....	77

<b>Tabela 31</b> – Resultado do valor do teste de Fisher e do valor crítico de Fisher para o teste da homogeneidade de variância do padrão ICE-3.....	77
<b>Tabela 32</b> – Retas de calibração de cada padrão com o respetivo valor de $S_{y/x}$ e declive ( $m$ ) necessário para a obtenção dos limiares analíticos.....	78
<b>Tabela 33</b> – Limites de quantificação e deteção obtidos para todos os padrões com as respetivas gamas de trabalho .....	78
<b>Tabela 34</b> – Valores obtidos durante a análise da repetibilidade usando uma amostra de uma cerveja Super Bock do Lote L2206901.....	79
<b>Tabela 37</b> – Média, desvio-padrão, limite de repetibilidade e CV para o estudo da repetibilidade usando amostras de cervejas Super Bock independentes do lote L2206901.....	80

# **Capítulo I**

Enquadramento do trabalho

# 1.A empresa

A *Super Bock Group* (SBG) é uma empresa portuguesa mundialmente conhecida pelo seu fabrico de cerveja e de águas engarrafadas. Representa a maior empresa portuguesa na comercialização de bebidas como: cervejas, refrigerantes, sidras e vinhos. Devido à sua elevada presença a nível nacional, também está envolvida na comercialização de café e no turismo. A entrada no setor turístico foi dada com a compra da totalidade da *VMPS* (Vidago, Melgaço e Pedras Salgadas) em 2002, que inclui os parques naturais e as unidades termais e hoteleiras. Em 2005 o parque foi requalificado dando a abertura ao projeto *Aquanattur*.<sup>[1]</sup>

Atualmente, a SBG, possui uma atividade comercial em mais de 50 países distribuídos em África, Europa, América, Pacífico e Médio Oriente. O mercado angolano e o europeu são os que mais contribuem para o seu crescimento fazendo com que esta ocupe o lugar principal em cerveja portuguesa. Em Angola, a cerveja *Super Bock* tem o seu lugar no topo entre as marcas de cerveja exportadas. No Brasil, a *Águas das Pedras* garantiu a sua presença em 350 pontos de venda e, na Arábia Saudita, em 2013, chegaram os primeiros litros de *Super Bock* sem álcool. Pode-se verificar que a presença da *Super Bock Group* no mundo está a ganhar notoriedade e, sendo uma empresa inovadora, está a apostar em criar produtos que se adaptam a cada cultura e a cada continente.<sup>[1]</sup>



*Figura 1: Logotipo da atual Super Bock Group*

## 1.1 História

A *CUFP* (*Companhia União Fabril Portuense*) foi criada a 7 de março de 1890 em plena industrialização no sector das bebidas e foi criada a partir da união de sete fábricas das quais algumas já existiam há várias décadas.<sup>[2]</sup>

A 9 de novembro de 1927 é emitido o registo da marca *Super Bock*.<sup>[2]</sup>

No dia 30 de agosto de 1975 a *CUFP* foi nacionalizada, porém em dezembro de 1977 o

Estado Português reestruturou o setor de bebidas agregando as cinco empresas nacionalizadas em apenas duas, a *Centralcer* e a *Unicer* (União Cervejeira, que reuniu a *CUFP* e a *COPEJA*). Entre 1979 e 1989 a produção da *Unicer* triplicou e no final da década as vendas de cerveja da *Unicer* ultrapassavam os 300 milhões de litros. Nesta época de crescimento, a *Unicer* começou a apostar na exportação dos seus produtos e, em 1983 foram exportados um milhão de litros de cerveja e em 1988 mais de 4 milhões de litros. [2]

Devido aos elevados indicadores económicos e financeiros da *Unicer* nos anos oitenta, esta foi escolhida pelo governo para que, a 26 de abril de 1989, na *Bolsa de Valores do Porto*, 49% do capital fosse privatizado. Após um século de existência a *Unicer* comemorou o seu aniversário privatizando 51% do seu capital ainda detido pelo estado. Com todo este sucesso de vendas esta decidiu investir na modernização tecnológica em todos os setores e rejuvenesceu as suas marcas e a sua imagem. A partir deste momento, a marca *Super Bock* expandiu a sua popularidade e começou a participar em eventos importantes como por exemplo, o festival de Verão *Super Bock Super Rock*. Em 1992 a *Unicer* começou a produzir e a comercializar a *Carlsberg* em Portugal. [2]



Figura 2: Instalações da *Super Bock Group*

Em 2000 ocorreu a mudança da denominação, passou de *Unicer – União Cervejeira, SA*, para *Unicer – Bebidas de Portugal, SA*. Neste mesmo ano a *Unicer* adquiriu o capital da empresa, *A Caféeira S.A.*, dando entrada no setor dos cafés e, procedeu à compra da *Quinta do Minho e de Vimompor – Sociedade Vinícola de Monção* dando entrada no setor dos vinhos. Em 2001 a empresa transformou-se numa sociedade gestora de participações sociais (SGPS) reorganizando e autonomizando diversas unidades de negócio. Em 2002, a *Unicer* procedeu a mais uma compra, a compra da *VMPS – Vidago, Melgaço e Pedras Salgadas* entrando assim também no setor turístico. [2]

No dia 11 de novembro de 2017 a *Unicer* ganha uma nova identidade passando a designar-se *Super Bock Group*. Esta nova designação teve como objetivo simbolizar as suas

cervejas qualificadas, dar um crescimento contínuo e fortalecer a sua principal marca, a *Super Bock*. Atualmente, a cerveja *Super Bock* é comercializada em mais de 50 países. [2]

## 2. Enquadramento e apresentação do projeto

O presente projeto foi desenvolvido nas instalações da empresa *Super Bock Group*, Centro de Produção de Cerveja Leça do Balio, no âmbito da unidade curricular Estágio do Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análises Químicas da Universidade do Porto.

O objetivo do trabalho consistiu na implementação e validação de um método de quantificação de compostos de amargor presentes na cerveja e em cerveja produzida por *dry hopping*. Numa fase inicial, foram realizadas pesquisas bibliográficas referentes ao método de forma a obter uma familiarização do equipamento e a responder às necessidades da empresa.

Durante a realização do projeto, foi verificado que o método inicial revelava algumas falhas e o equipamento apresentava problemas técnicos tendo sido necessário pesquisar formas de solucionar o mesmo. Sendo assim, após algumas trocas de material e alguns ajustes no método inicial, este apresentou resultados satisfatórios e foi possível proceder à sua implementação e validação. Devido a todos estes contratemplos, tornou-se possível a obtenção de conhecimentos técnicos mais aprofundados sobre o equipamento e o desenvolvimento do método.

## 3. Organização do Relatório de Estágio

No primeiro capítulo é feita a apresentação da empresa, a apresentação do projeto desenvolvido e uma descrição sobre a organização do presente relatório de estágio.

No segundo capítulo, o foco são os fundamentos teóricos necessários para o projeto. A apresentação da cerveja, nomeadamente a sua história e o seu processo de produção, a explicação sobre o papel do lúpulo na cerveja, como todos os seus constituintes químicos dando prioridade às resinas macias (ácidos  $\alpha$  e ácidos  $\beta$ ) e às humulinonas. Neste capítulo introdutório também se encontram explicados todos os passos envolvidos para proceder a uma validação de um método e o seu controlo de qualidade químico.

O terceiro capítulo consiste exclusivamente na descrição detalhada do método utilizado na execução deste projeto assim como o material e o equipamento necessários para o mesmo.

No quarto capítulo são apresentados todos os resultados obtidos com as respetivas discussões e observações.

No quinto capítulo encontram-se as considerações finais deste presente projeto.

Este relatório de estágio também apresenta ficheiros em anexo que são necessários para uma melhor compreensão.

## **Capítulo II**

Introdução

# 1. Cerveja

A cerveja é uma bebida popular consumida por diferentes faixas etárias que pode ser encontrada em todos os pontos do mundo. A sua etimologia provém do latim e vem do nome da deusa romana da agricultura *Ceres*, da qual a sua raiz comum é facilmente perceptível no português “*cerveja*” e no espanhol “*cerveza*”. A palavra latim *biberis*, que significa beber, deu origem ao nome em alemão “*bier*”, em inglês “*beer*”, em francês “*bière*” e em italiano “*birra*”. Considera-se que esta seja umas das bebidas alcoólicas mais antigas. [3]



Figura 3: Exemplo de apresentação da cerveja

É produzida a partir de malte de cevada, água, lúpulo e fermento. Os países que não possuem malte de cevada suficiente produzem a cerveja a partir de substitutos do mesmo como arroz, milho ou trigo. No entanto, para ser considerada cerveja, esta tem de possuir uma proporção de malte de cevada maior ou igual a 50% [4,5]

Do ponto de vista nutricional, a cerveja apresenta um elevado teor em vitaminas do complexo B e um elevado poder antioxidante. Os compostos responsáveis pelos processos antioxidantes são as procianidinas, as epicatequinas e o ácido ferúlico. A sua capacidade antioxidante e o seu baixo teor alcoólico, permitem melhorar a atividade antioxidante do plasma reduzindo o risco de doenças coronárias sem os aspetos negativos provocados por elevadas quantidades de etanol. [4]

É uma bebida que apresenta um equilíbrio quimicamente instável entre o sabor e o aroma porque sofre oxidação durante o seu armazenamento. A sua qualidade está diretamente relacionada com o teor dos compostos voláteis e não voláteis como por exemplo, os estéres, os aldeídos, as dicetonas vicinais, os ácidos orgânicos e os ácidos  $\alpha$ . A bebida perde qualidade quando destes compostos surgem aromas e sabores indesejados constituindo esse um grande problema na indústria cervejeira. [4]

A cerveja pode ser dividida em dois grandes grupos, as *Ale* e as *Lager*. O tipo *Ale* é produzido a partir da fermentação superficial que é realizada a um intervalo de temperaturas

entre 20 °C e 25 °C com uma duração de 2 a 5 dias. Apresentam cor clara, são ligeiramente ácidas e possuem um sabor intenso a lúpulo. O seu teor alcoólico varia entre 4 e 8%. As cervejas que mais se destacam neste grupo são a *Porter* e a *Stout*. O tipo *Lager* é produzido a partir de uma fermentação profunda e apresentam uma cor clara e um sabor suave. Este tipo de fermentação é feito a temperaturas entre 3,3 e 13 °C e tem uma duração de fermentação e maturação de 4 a 12 semanas. <sup>[7]</sup> O seu teor alcoólico varia entre 4 e 8% e as cervejas pertencentes a este grupo são as *Pilsen*, a *Muniqué* e a *Bock*. <sup>[5,6]</sup>

## 1.1 Matérias primas

A cerveja é constituída essencialmente por água, malte de cevada, lúpulo, açúcares, leveduras e aditivos tecnológicos. <sup>[7]</sup>

### 1.1.1 Água

A água corresponde aproximadamente a 90% da composição em massa da cerveja sendo assim o principal constituinte da bebida. Existem dois tipos de água usados na fabricação de cerveja: a água cervejeira e a água de serviço. <sup>[4][7]</sup> A água cervejeira, tal como o nome indica, é usada durante o processo de produção de cerveja, mais precisamente na molha do malte e na limpeza dos barris e das garrafas. A água deve ser dura (rica em cálcio e magnésio) e livre de contaminações. <sup>[7]</sup> Como a água cervejeira se encontra diretamente ligada à cerveja esta deve respeitar certos requisitos como:

- Livre de turbidez: A água tem de ser filtrada para não possuir partículas em suspensão de natureza orgânica ou inorgânica. Isto porque, estas partículas podem servir de nutrientes para os microrganismos e interferir no processo de desinfeção. <sup>[4]</sup>
- Controlo de pH: O pH deve estar compreendido entre 5 e 9,5 para que exista um equilíbrio na atividade enzimática, para não existir uma alteração de cor e não variar a coagulação dos componentes proteicos do mosto. <sup>[4]</sup>
- Padrões microbiológicos: A água deve ser límpida, sem sabor e livre de microrganismos. Para garantir estas características é importante existir um plano de higienização e um controlo contínuo. <sup>[4]</sup>

### 1.1.2 Malte

O malte é obtido a partir da cevada através da maltagem. A maltagem pode ser dividida em três passos: a molha, a germinação e a secagem. Na molha o malte é coberto com água com o objetivo de o preparar para a germinação. A água é escorrida a elevadas temperaturas (30 °C). A germinação consiste em ativar o grão de forma a este libertar uma radícula externa. Durante a germinação é de extrema importância existir um controlo de temperatura e de humidade para garantir a qualidade do malte. O processo de secagem consiste em desumidificar o malte através de ar frio e seco. Variando as condições de maltagem (temperatura e humidade), obtém-se diferentes tipos de malte fazendo com que a cor e as características aromáticas da cerveja sejam assim alteradas. Durante a maltagem, o amido do malte é convertido em açúcares, como por exemplo em maltose e em glicose e este, sendo um composto rico em proteínas, também fornece os aminoácidos necessários para o crescimento da levedura. Outro fator favorável, é a presença de substâncias nitrogenadas que representam um papel fundamental na formação da espuma. [4,7,8]

### 1.1.3 Lúpulo

O lúpulo é a matéria-prima responsável pela preservação da cerveja. Durante a produção de cerveja, podem usar-se diferentes tipos de lúpulo tendo em conta o sabor e o aroma final pretendido. O lúpulo é rico em óleos essenciais que conferem o aroma, e em resinas, que conferem o amargor. Também contribui para a qualidade da espuma e para a proteção contra microrganismos. Sendo esta a matéria-prima essencial para a realização deste projeto esta será apresentada mais detalhadamente no ponto dois deste capítulo.

### 1.1.4 Leveduras

A levedura mais frequentemente usada no processo cervejeiro é denominada por *Sacharomyces cerevisiae*. As leveduras que flutuam na superfície após a fermentação são denominadas por leveduras de alta fermentação enquanto que as leveduras que se encontram no fundo são denominadas por leveduras de baixa fermentação. As leveduras possuem a capacidade em metabolizar os constituintes do mosto. Depois da filtração do mosto, são adicionados o lúpulo e as leveduras, e os açúcares do mosto são convertidos em álcool e CO<sub>2</sub> com o objetivo de se produzir uma cerveja com uma estabilidade sensorial satisfatória e com qualidade. [8]

## 1.2 História da Cerveja

Os primeiros registos de produção de cerveja remontam a 4000 anos a.C. na antiga Suméria, na Mesopotâmia. Conta-se que esta tenha sido descoberta acidentalmente a partir de um alimento rico em centeio que sofreu degradação. Devido à fermentação alcoólica, a bebida apresentava um sabor agradável e despertou interesse fazendo com que um processo acidental se tenha transformado num processo padronizado de fabricação. [3]

O processo de fabrico da cerveja consistia em moer, misturar com água e assar o malte constituído por grãos de cevada germinados. Eram colocados pedaços de pão na água de forma a ocorrer a fermentação alcoólica e posterior obtenção de cerveja. A descoberta dos sumérios dispersou-se pelos povos babilónios, egípcios, gregos e romanos. Antes do início da era cristã, a cerveja foi descoberta pelos povos germânicos que consideravam que a cerveja era a típica bebida dos pobres devido ao vinho continuar a ser a bebida de eleição dos ricos. [3]

Quando o império romano entrou em colapso, no século V, os monges preservaram o processo de fabrico em escrito. Os mosteiros tornaram-se então grandes produtores de cerveja durante a idade média. Um dos mosteiros destacados nesta época foi o mosteiro de *Weihenstephan*, perto de Munique, que é considerada a mais antiga cervejeira no mundo e que ainda continua em funcionamento. [3]



Figura 4: Mosteiro de Weihenstephan, a cervejeira em funcionamento mais antiga do mundo

O rei flamengo Gambrinus, no século XII, adicionou pela primeira vez o lúpulo à cerveja tornando este ingrediente essencial no fabrico da mesma. Nesta época também se começou a notar a relação entre a qualidade das águas utilizadas durante a fabricação da cerveja e a qualidade da cerveja e, conseqüentemente, as regiões que possuíam uma boa qualidade de águas minerais começaram a investir em fábricas de cerveja. [3]

Em 1516, o duque Guilherme IV da Baviera decretou a lei *Reinheitsgebot* (Lei da pureza) que indicava que os únicos ingredientes permitidos no fabrico de cerveja seriam a cevada, o lúpulo, o fermento e a água. Em 1810 começou-se a festejar o *Oktoberfest* (festa

de outubro) em Munique que resultou da comemoração do casamento do rei Luis I da Baviera com a princesa Tereza de Saxónia. [3]

No século XIX, a fabricação de cerveja sofreu uma grande revolução com a descoberta científica de Louis Pasteur, Carl Von Linde e Emil Christian Hansen. Pasteur possibilitou a identificação das leveduras responsáveis pela fermentação da cerveja, bem como os fungos e bactérias responsáveis pela sua deterioração. Para além disso, também descobriu a pasteurização, o processo de conservação de alimentos. Linde desenvolveu técnicas de refrigeração que permitiram a produção de cerveja de baixa fermentação o ano inteiro. Hansen, por fim, conseguiu distinguir os vários tipos de leveduras responsáveis por cada tipo de cerveja. [3]

### 1.3 Processo de produção da Cerveja

Cada tipo de cerveja tem o seu processo de produção característico, mas, na sua generalidade, a produção de cerveja envolve nove passos fundamentais (podendo estes variar).

#### 1.3.1 Moagem

O processo de produção de cerveja começa com a moagem dos cereais. Para que o malte seja utilizável para a produção de cerveja, este tem de estar em forma de farinha. Para obter uma estrutura farinhenta, é usado um moedor ou um moinho, uma vez que, os cuidados tomados durante a moagem vão depender da qualidade do malte e da cerveja. A moagem dos grãos de malte tem como objetivo expor o endosperma que se encontra contido no seu interior e diminuir o tamanho das partículas do amido para aumentar a sua hidrólise. [6-9]



Figura 5: Exemplo ilustrativo de malte

### 1.3.2 Empastagem

Durante a empastagem, o malte moído é armazenado em tanques onde é aquecido e misturado com água. As enzimas presentes no malte vão ser libertadas promovendo a hidrólise do amido. As enzimas beta-amílase, alfa-amílase e limite-dextrinase vão atuar com o objetivo de promover a produção dos açúcares que são os responsáveis pelo álcool e o CO<sub>2</sub> na cerveja. A temperatura não pode ultrapassar os 72 °C para não ocorrer a inativação das enzimas. O envelope que reveste os grãos de malte tem como função o impedimento da entrada de água e de enzimas no seu interior. Este bloqueia a libertação do endosperma e é fundamental para permitir uma empastagem eficiente. [6-9]



Figura 6: Exemplo ilustrativo de mosto

### 1.3.3 Filtração do mosto

Como o próprio nome indica, o mosto é filtrado de forma a separar a parte insolúvel do filtrado. A parte insolúvel é normalmente reaproveitada como alimento para o gado e o filtrado representa o mosto diluído. Esta filtração é feita recorrendo a um filtro prensa ou a uma cuba de filtro e tem uma duração de aproximadamente 2 ou 3 horas. A temperatura de filtração ronda os 75 °C. [6-9]

### 1.3.4 Ebulição do mosto

O mosto é levado à ebulição durante cerca de 2 horas. Esta fase é de extrema importância porque é neste que ocorrer a adição do lúpulo. O processo de ebulição tem como finalidades a solubilização e transformação das substâncias amargas do lúpulo, a eliminação das substâncias voláteis não desejáveis e a esterilização do mosto. Durante a ebulição ocorre a formação de um precipitado proteico com peso molecular elevado. Este precipitado e os componentes do lúpulo não solubilizados são, após a ebulição, separados do mosto quente.

[6-9]

### 1.3.5 Fermentação

Antes de inserir o mosto nas cubas de fermentação, é essencial arrefecer o mosto até uma temperatura de cerca de 9°C e proceder ao seu arejamento. Quando o mosto se encontra nas cubas de fermentação, são adicionadas as leveduras próprias para o tipo de cerveja desejada e durante este processo, os açúcares do mosto, através da ação das leveduras, são transformados em álcool e CO<sub>2</sub>. A fermentação tem uma duração de aproximadamente sete dias e é feita com controlo de temperaturas. No início a fermentação é agitada tornando-se progressivamente mais lenta até as leveduras se depositarem no fundo das cubas.

No final da fermentação, apesar de ainda serem necessárias outras etapas, já se obtém cerveja. [6-9]

### 1.3.6 Maturação

Representa a estabilização da cerveja entre 0°C e 2°C num tanque de maturação de forma a permitir o equilíbrio coloidal e a fixação das propriedades físicas. A cerveja que é obtida antes de maturação é denominada por cerveja verde. No final da maturação é realizada a clarificação. Esta operação elimina elementos ainda em suspensão de forma a se obter uma cerveja límpida que é posteriormente armazenada em tanques. [6-9]

### 1.3.7 Segunda filtração

A segunda filtração remove as partículas que ainda se encontram em suspensão na cerveja de forma a torná-la mais clara. Durante este processo é adicionada a terra diatomácea. A utilização de um filtro de terra diatomácea tem inúmeras vantagens como por exemplo, uma filtração com elevada eficiência, uma regeneração rápida e fácil e uma filtração com um fluxo estável (o fluxo não diminui com o entupimento da camada de filtro). [8,10]

### 1.3.8 Acabamento

O último passo consiste na adição de substâncias responsáveis pela qualidade da bebida. Na fermentação, quando as leveduras metabolizam os açúcares, libertam CO<sub>2</sub> e etanol. O CO<sub>2</sub> libertado não é suficiente para o efeito final desejado na cerveja sendo necessário recorrer ao processo de carbonatação. A carbonatação consiste num processo químico causado pela dissolução de CO<sub>2</sub> em água. Esta ação vai provocar um borbulhamento no líquido dando origem ao ácido carbónico (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). O H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> tem facilidade em decompor-se

novamente em água e  $\text{CO}_2$  e por isso, quando adicionado à cerveja, vai aumentar a quantidade de  $\text{CO}_2$  e água na mesma. A carbonatação é um processo importante que permite manter o efeito organolético da cerveja, isto é, o  $\text{CO}_2$  proporciona a cor, o brilho, o odor, o sabor e a textura da bebida. Para manter a qualidade e o sabor da cerveja é necessário monitorizar a quantidade deste gás adicionada. <sup>[11]</sup>

O dióxido de enxofre também apresenta grande importância no acabamento da cerveja. Este é formado através do sulfato do mosto e tem como função a absorção do oxigénio presente na cerveja. Quando o oxigénio é absorvido, o sabor da cerveja é influenciado positivamente inibindo assim a sua oxidação. <sup>[12]</sup>

### **1.3.9 Armazenamento**

A cerveja é engarrafada em garrafas limpas com uma solução de hidróxido de sódio. A limpeza dos barris e das garrafas é de extrema importância porque esta previne o aparecimento de microrganismos deteriorantes ou patogénicos e garante a qualidade e segurança do produto. <sup>[8]</sup>

## 2. Lúpulo

O lúpulo representa uma das principais matérias primas na produção de cerveja sendo este o grande responsável pelo gosto amargo característico desta bebida. O seu nome científico é *Humulus lupulus* o qual pertence à família *Cannabaceae* e à ordem das *Rosales*. O género *Humulus* é composto por três espécies, o *H. lupulus*, o *H. japonicus* e o *H. yunnanensis*, porém apenas o *H. lupulus* tem interesse para a indústria cervejeira. Para a produção de cerveja, apenas é usada a planta feminina não fertilizada devido a esta possuir glândulas de lupulina. Estas glândulas possuem os compostos químicos responsáveis pelo sabor característico da cerveja como as resinas (responsáveis pelo amargor), os polifenóis (com propriedades antioxidantes) e os óleos essenciais (conferem o aroma). O amargor conferido pelo lúpulo tem como função equilibrar os açúcares do malte de forma a evitar que a cerveja tenha um gosto doce e um carácter sensorial enjoativo.

O lúpulo possui inúmeras outras características favoráveis como por exemplo, a estabilidade coloidal da espuma, a proteção contra microrganismos e a conservação da cerveja. Podem usar-se diferentes tipos de lúpulo tendo em conta o aroma e o sabor final pretendido e, a quantidade de lúpulo adicionada e diretamente proporcional ao fator de amargor, isto é, quanto maior a quantidade de lúpulo adicionada mais amarga será a cerveja. [10,11]



Figura 7: Flores de Lúpulo

### 2.1 Composição química do Lúpulo

Como dito anteriormente, as glândulas de lupulina possuem inúmeros compostos químicos e as proporções destes pode variar com a variedade do lúpulo, com o local e a técnica de cultivo, com a maturação, com a secagem e com o armazenamento do mesmo. Os

principais constituintes químicos presentes no lúpulo e as respectivas quantidades estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Principais constituintes químicos presentes no lúpulo com as respectivas quantidades<sup>[11]</sup>

<b>Principais constituintes químicos presentes no Lúpulo</b>	<b>Quantidade (m/m)</b>
Resinas Totais	15-30 %
Pectinas	2 %
Óleos essenciais	0,5 – 3 %
Proteínas	15 %
Monossacarídeos	2 %
Polifenóis	4 %
Água	10 %
Celulose	43 %
Aminoácidos	0,1 %
Ceras e esteróis	25 %
Cinzas	8 %

Os compostos mais importantes no processo cervejeiro são as resinas totais, os óleos essenciais e os polifenóis. Os óleos essenciais são responsáveis por conferir ao mosto e à cerveja o aroma do lúpulo, mas, sendo estes compostos voláteis, durante a ebulição do mosto a maioria é evaporada. Para evitar perdas, a adição de lúpulo é feita em dois momentos principais, no início da ebulição, para extrair o amargor, e no final da ebulição, para extrair o aroma do lúpulo. Os polifenóis influenciam o paladar e o corpo da cerveja além de possuírem efeitos antissépticos e bacteriostáticos. Estes são removidos durante a ebulição do mosto por precipitação com proteínas, contudo, a adição de polifenóis não afeta a cor ou a espuma da cerveja, mas quando presentes em elevadas quantidades, podem afetar a estabilidade coloidal. O maior interesse para este projeto encontra-se nas resinas, uma vez que estas são as principais responsáveis por conferir amargor à cerveja. <sup>[10,11]</sup>

### 2.1.1 Resinas Totais

As resinas totais podem ser divididas em resinas macias e em resinas duras. As resinas macias são solúveis em hexano e constituem 10 – 25% das resinas totais. As resinas duras são solúveis em metanol e constituem 3 – 5% das resinas totais. A denominação de

macias e duras provêm do facto das primeiras possuírem um aspeto viscoso amarelado e das segundas apresentarem um aspeto sólido de cor verde. [11]

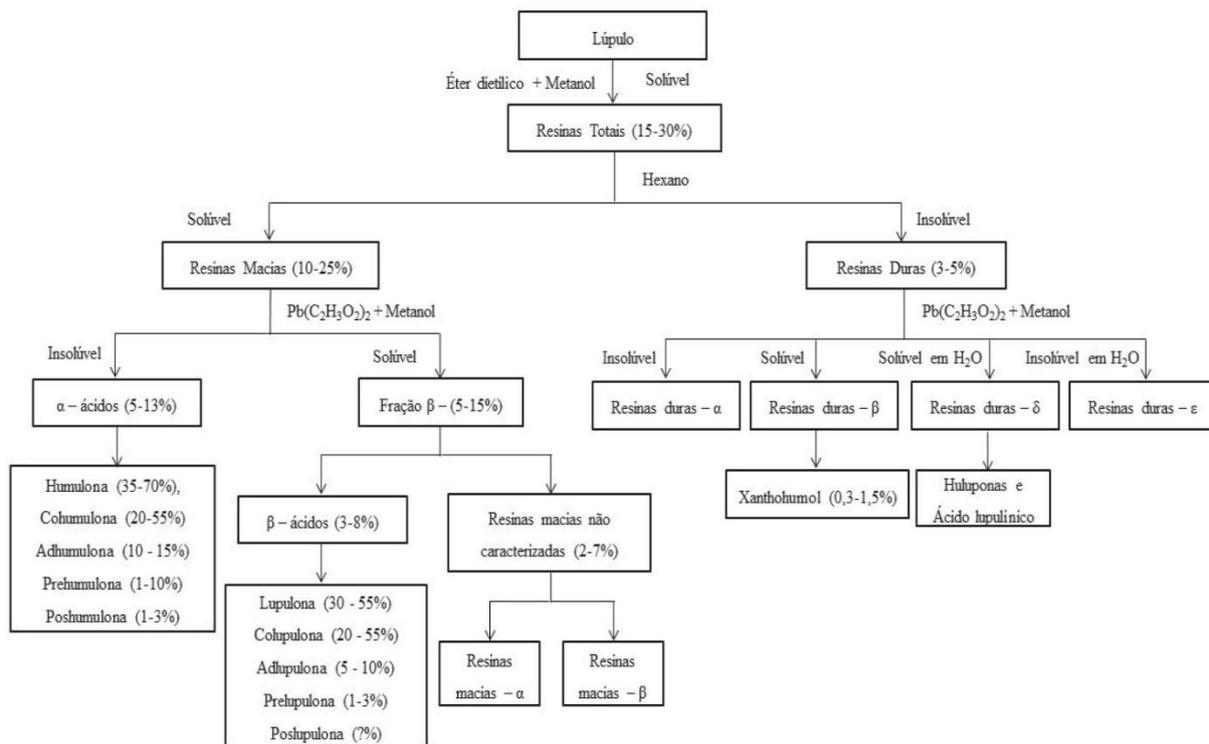


Figura 8: Principais constituintes das resinas totais do lúpulo [11]

## 2.1.2 Resinas macias

As resinas macias dividem-se em ácidos  $\alpha$  (humulonas) e em ácidos  $\beta$  (lupulonas). Os ácidos  $\alpha$  e os ácidos  $\beta$  são homólogos com estruturas químicas muito semelhantes entre si e são os grandes responsáveis pelo amargor da cerveja. [11]

Os ácidos  $\alpha$  são compostos por cinco humulonas análogas: a humulona, a cohumulona, a adhumulona, a prehumulona e a posthumulona. Os ácidos  $\beta$  por sua vez, também são compostos por cinco lupulonas análogas sendo estas, a lupulona, a colupulona, a adhupulona, a prelupulona e a poslupulona.

### 2.1.2.1. Ácidos $\alpha$

A humulona é a principal responsável pelo amargor conferido ao produto devido a esta sofrer isomerização originando os iso- $\alpha$ -ácidos ou iso-humulonas que são mais amargos e mais solúveis em água do que as humulonas. Para permitir este processo de isomerização e

expor os ácidos  $\alpha$  a elevadas temperaturas é usada a técnica de lupulagem tradicional, ou seja, o lúpulo é adicionado durante a ebulição do mosto. <sup>[11]</sup>

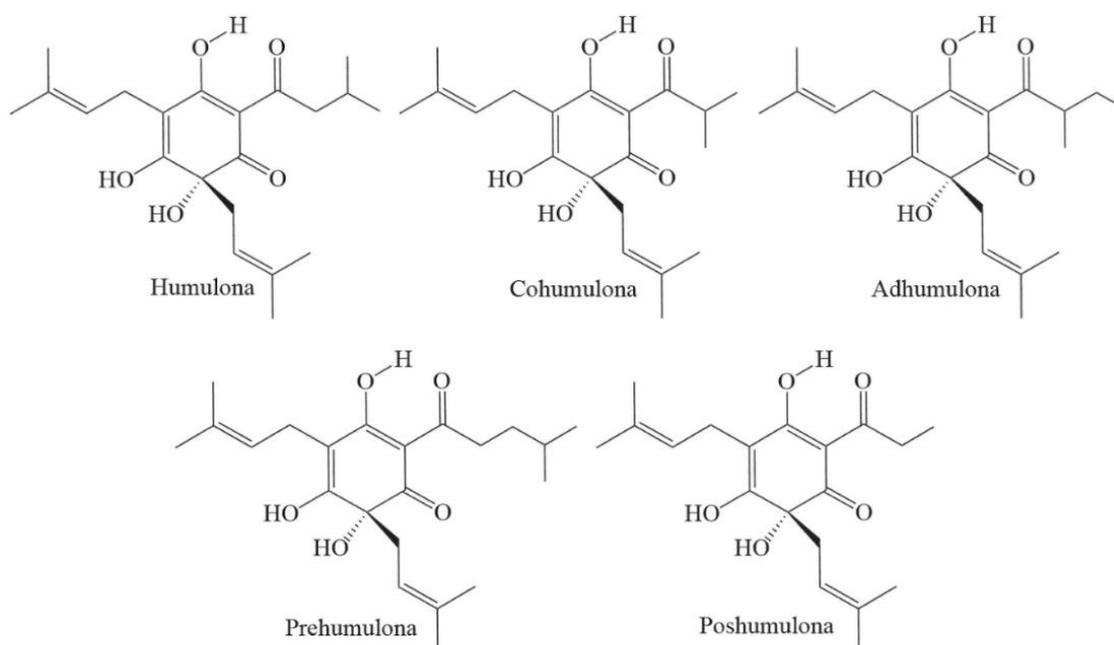


Figura 9: Estrutura química dos principais ácidos  $\alpha$  <sup>[11]</sup>

Os iso- $\alpha$ -ácidos principais resultantes desta reação de isomerização durante a ebulição do mosto são a isocohumulona, a isohumulona e a isoadhumulona. <sup>[11]</sup>

Cada iso- $\alpha$ -ácido pode ser encontrado em duas formas distintas de diastereoisómeros, na forma *cis* e na forma *trans* sendo as *cis*-iso-humulonas mais amargas do que as *trans*-iso-humulonas. Estes dois estereoisómeros também possuem diferentes potenciais no que diz respeito à estabilidade da espuma devido ao carácter hidrofóbico de cada um. A denominação *cis* e *trans* é feita relativamente ao grupo OH do carbono 4 e o grupo isoprenil do carbono 5 do anel (Figura 10). <sup>[11]</sup>

O isómero *cis* confere mais amargor à cerveja do que o isómero *trans* e, por sua vez, o isómero *trans* move-se mais facilmente na espuma do que o isómero *cis* aparecendo assim em maior quantidade. <sup>[10]</sup>

A humulona, foi a primeira fração a ser obtida em forma cristalina e a ser caracterizada por *Lintner e Schnell* em 1904. As humulonas são solúveis em todos os solventes orgânicos, são ácidas (pKa de 5,4) e possuem um gosto amargo fraco.

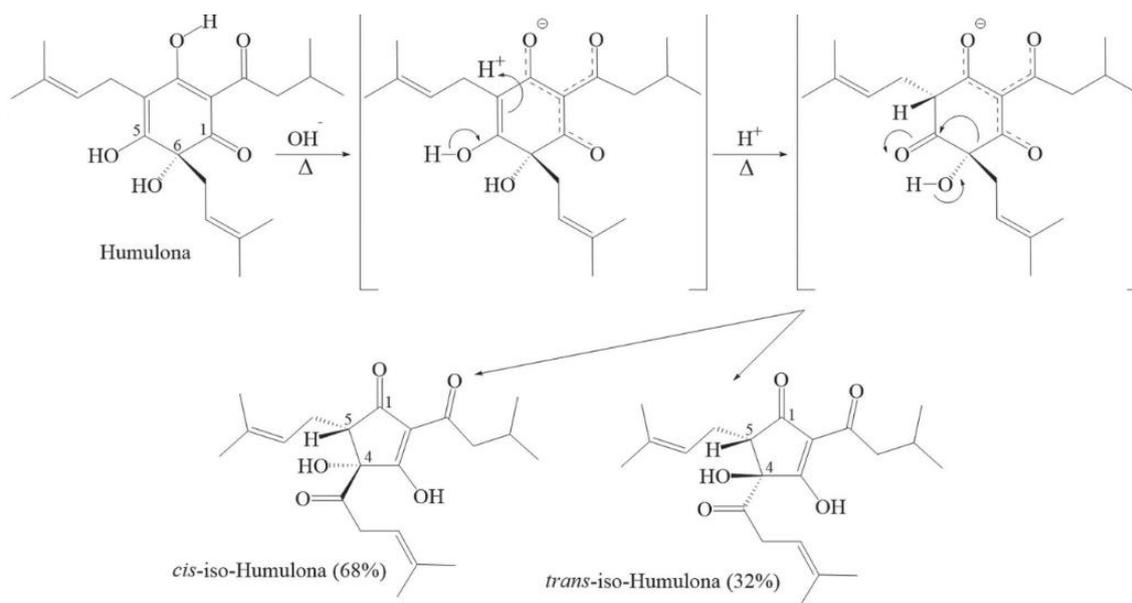


Figura 10: Representação da isomerização da humulona em *cis/trans*-iso-humulonas <sup>[11]</sup>

A estabilidade coloidal da espuma é obtida através da adição de derivados hidrogenados dos ácidos  $\alpha$ , as tetra-hidro-iso-humulonas. Sendo estes compostos hidrofóbicos e a cerveja maioritariamente constituída por água e outros compostos hidrossolúveis, o fator líquido/ar vai aumentar aumentando assim o teor e a persistência da espuma da cerveja. <sup>[11]</sup>

### 2.1.2.2. Ácidos $\beta$

Os ácidos  $\beta$  ou lupulonas, são estruturalmente semelhantes aos ácidos  $\alpha$  mas menos ácidos. Estes possuem uma cadeia lateral isoprenóide que os torna mais hidrofóbicos e praticamente insolúveis em meio aquoso e, conseqüentemente, pouco presentes na cerveja.

As lupulonas possuem ações antimicrobianas sendo assim as responsáveis pela estabilidade microbiológica da cerveja. <sup>[11]</sup>

Os ácidos  $\beta$  são muito lábeis e a transformação destes, durante a produção da cerveja, é bastante distinta dos ácidos  $\alpha$ . Ao contrário dos ácidos  $\alpha$ , os ácidos  $\beta$  são suscetíveis a uma larga variedade de estados de oxidação que envolvem as ligações duplas do grupo prenilo. A maioria dos produtos de oxidação têm propriedades organoléticas desagradáveis e a formação destes deve ser evitada. As lupulonas têm um sabor amargo intenso e podem ser responsáveis pela perda de ácidos  $\alpha$  em lúpulo antigo. <sup>[11]</sup>

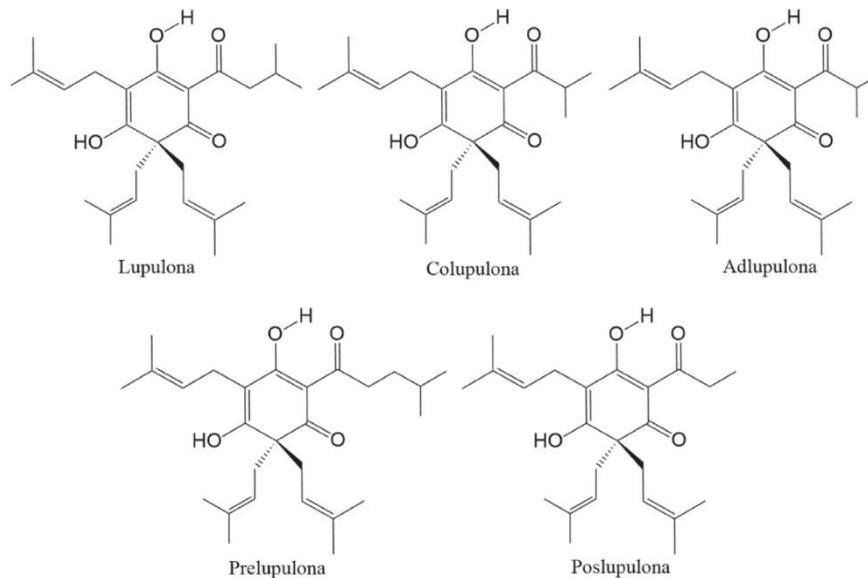


Figura 11: Estrutura química dos principais ácidos  $\beta$  <sup>[11]</sup>

### 2.1.3. Humulinonas

As humulinonas provêm da oxidação das humulonas ou ácidos  $\alpha$  e são o resultado de um processo de degradação durante o armazenamento do lúpulo. O mecanismo de obtenção de humulinonas a partir de humulonas é um mecanismo radicalar a frio na presença de luz (Figura 12). <sup>[11]</sup>

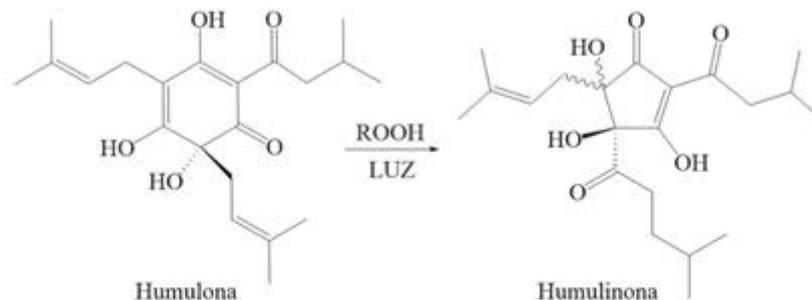


Figura 12: Conversão das humulonas em humulinonas através de um mecanismo radicalar e na presença de luz <sup>[11]</sup>

Quando utilizada a técnica de lupulagem *dry-hopping*, os ácidos  $\alpha$  ao invés de sofrer isomerização e dar origem a iso- $\alpha$ -ácidos, estas sofrem oxidação e dão origem a humulinonas.

O *dry-hopping* é um processo de lupulagem em que o lúpulo é adicionado à cerveja diretamente no tanque após a ebulição e o arrefecimento do mosto. Esta técnica de lupulagem tem como função extrair os óleos essenciais do lúpulo porque, quando adicionado durante a ebulição, estes são evaporados e perdidos. Este processo não tem como objetivo conferir

amargor à bebida, uma vez que, por ser um processo a frio, não há formação de iso- $\alpha$ -ácidos. As humulinonas são um fator importante de análise quando é usado a lupulagem *dry-hopping* devido a estas possuírem um teor de amargor de 66% igual aos iso- $\alpha$ -ácidos o que as leva a contribuir consideravelmente no aumento de amargor da bebida. Um dos fatores para evitar a formação de humulinonas, ou reduzir, é evitar lúpulos antigos e oxidados. <sup>[11]</sup>

## 2.2 Técnicas de lupulagem

A adição de lúpulo, ou lupulagem, é o passo fundamental para se obter as características sensoriais desejadas da cerveja e para aumentar o seu tempo de conservação. Os óleos essenciais e as resinas, os principais constituintes de interesse do lúpulo na produção de cerveja, têm tendência a evaporar quando sujeitos a temperaturas elevadas durante longos períodos, provocando assim a perda de aroma e amargor. De forma a evitar tais perdas, e de conferir diferentes tipos de características à cerveja, foram criadas várias técnicas de lupulagem.

### 2.2.1 Técnica tradicional

A técnica tradicional consiste em adicionar o lúpulo durante a ebulição do mosto. A adição pode ser feita no início da ebulição, *early kettle*, ou no meio, *middle boil*. Quando a adição é realizada no início da ebulição, o lúpulo está em contacto com o mosto durante 1 ou 2 horas conferindo amargor à cerveja através de um processo de isomerização das resinas. Usando este método o aroma é perdido devido à evaporação dos óleos essenciais. Ao contrário, quando a adição do lúpulo é realizada a meio da ebulição, a cerveja apresenta amargor e aroma em concentrações intermediárias devido a não ocorrer a evaporação total dos óleos essenciais. <sup>[12-14]</sup>

### 2.2.2 Lupulagem na empastagem - *Mash hopping*

Neste processo a adição de lúpulo é realizada durante a empastagem da cerveja. Com esta técnica, pouco amargor é conferido à cerveja devido ao lúpulo ficar retido na *dreche* durante a filtração e não permitir a isomerização das resinas. Os óleos essenciais vão evaporar durante a ebulição do mosto e, conseqüentemente, os componentes retidos na cerveja vão ser compostos não voláteis que sofreram oxidação antes da ebulição. A cerveja não vai apresentar amargor, mas apenas o aroma destes compostos não voláteis. <sup>[12-14]</sup>

### **2.2.3 Lupulagem antes da ebulição e após a filtração do mosto - *First Wort Hopping***

Nesta técnica a adição de lúpulo é feita antes da ebulição e depois da filtração do mosto. Como a adição é realizada antes da ebulição, a baixas temperaturas, os compostos voláteis não solúveis presentes nos óleos essenciais vão sofrer oxidação e tornar-se solúveis ao invés de evaporar. Obtém-se assim um aroma característico destes compostos, um aroma mais apurado. Quando se recorre a esta técnica, é recomendável usar lúpulo com pouco teor de ácidos  $\alpha$  para não exagerar no nível de amargor e obter um sabor amargo mais macio. [12-14]

### **2.2.4 Lupulagem tardia - *Late Hopping***

A adição do lúpulo é feita 10 a 15 minutos antes do final da ebulição com o objetivo de fornecer mais aroma à cerveja e pouco amargor, isto é, permite reter o aroma dos óleos essenciais, mas não permite a isomerização das resinas. Assim, obtém-se uma cerveja com elevado aroma e baixo amargor. [12-14]

### **2.2.5 Lupulagem após a ebulição do mosto - *Whirlpool hopping***

A adição do lúpulo é feita entre a ebulição e o arrefecimento do mosto pelo que o lúpulo é adicionado à cuba de centrifugação. Como a lupulagem é feita após a ebulição, não será fornecido nenhum amargor à cerveja. Esta vai apresentar apenas o aroma dos óleos essenciais, um aroma mais frutado, floral ou cítrico. [12-14]

### **2.2.6 Lupulagem reversa - *Hop back***

A técnica de lupulagem *Hop back* é uma técnica alternativa ao *Whirlpool hopping*. Ao invés de se adicionar o lúpulo na cuba de fermentação, o lúpulo é adicionado num equipamento especializado para esta técnica. Este equipamento consiste numa cuba de menor tamanho em que o lúpulo se encontra numa rede de forma a que, quando adicionado o mosto quente, este passe pelo lúpulo fornecendo apenas aroma e não amargor. [12-14]

### **2.2.7 Lupulagem a frio - *Dry Hopping***

A lupulagem da cerveja por *dry hopping* consiste na adição de lúpulo a frio. O lúpulo é

adicionado na cuba durante a fermentação ou no barril durante a maturação. É indicado que a adição seja feita após a fermentação com o objetivo de não permitir a volatilização dos compostos aromáticos com o CO<sub>2</sub>. Assim, obtém-se uma cerveja sem amargor e com sabor aromático tropical ou resinoso. [12-14]

### **2.3 Técnicas para a determinação de ácidos $\alpha$ , ácidos $\beta$ e humulinonas em cerveja**

Os ácidos  $\alpha$ , ácidos  $\beta$  e as humulinonas são determinados recorrendo à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em fase reversa com um detetor UV-Vis conforme recomendado pela *Convenção Europeia do Fabrico de Cervejas* (EBC). [21] Esta técnica permite uma separação eficiente e uma posterior identificação e quantificação de todos os isómeros de interesse. É necessário usar uma fase móvel constituída por dois solventes, um orgânico puro e outro com uma percentagem entre 70-80% de solvente orgânico e 30-20% de solvente ácido. [16]

Antes do aparecimento do método por HPLC, os ácidos  $\alpha$  e  $\beta$  eram quantificados por espectrometria UV/Vis. Esta técnica permite obter um valor aproximado de amargor na amostra, mas não permite obter uma identificação dos compostos individualmente. Este método é acoplado com análises sensoriais de forma a garantir que o gosto da cerveja é agradável.

### 3. Validação de Métodos Analíticos

A validação e o controlo de qualidade são fatores essenciais para evidenciar e reconhecer a qualidade e viabilidade de um método analítico. Para que exista um controlo efetivo dos resultados, assim como, para garantir a fiabilidade e confiabilidade dos mesmos, um método analítico tem de ser exposto a uma serie de testes que garantam a sua validação. Segundo a norma ISO/IEC 17025, Requerimentos gerais de competências para Laboratórios de Ensaio e Calibração, a validação de um método analítico garante a credibilidade dos resultados e do equipamento utilizado. <sup>[17-19]</sup>

No setor alimentar, a qualidade do produto final é um fator extremamente importante tornando-se necessário que os laboratórios de análises na indústria alimentar demonstrem que os métodos internos usados fornecem resultados viáveis e que garantem a qualidade e a segurança do produto comercializado. Os métodos de análise devem estar descritos em procedimentos laboratoriais e, todos os equipamentos utilizados devem estar dentro das especificações exigidas, isto é, encontrarem-se em perfeito estado e estarem devidamente calibrados. <sup>[17-19]</sup>

Sempre que seja necessário alterar o procedimento de um método pré-existente, é necessário repetir os testes de validação para garantir que as alterações não afetam a qualidade e a viabilidade dos resultados. A exigência da validação depende da natureza do método. Os métodos usados em laboratório podem ser normalizados ou não normalizados. Os métodos normalizados são métodos que seguem documentos normativos e que tenham sido aprovados pelas entidades responsáveis. Estes sofrem atualizações periódicas e são nacionalmente e internacionalmente aceites. Os métodos não normalizados representam métodos internos que provêm da literatura científica e que tenham sido internamente ajustados ou que, tenham sido implementados pelo próprio laboratório. Quando os métodos são implementados no próprio laboratório, é necessário que o processo de validação seja mais rigoroso e que os laboratórios disponham de critérios e meios que demonstrem que dão origem a resultados com a qualidade pretendida. <sup>[17-19]</sup>

Segundo as diretivas da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), para que um método seja considerado validado tem de ser avaliados os seguintes parâmetros:

- Especificidade e seletividade;
- Sensibilidade;
- Limites analíticos;
- Linearidade e gama de trabalho;
- Precisão;
- Robustez

### 3.1 Identificação

Os testes de identificação têm como objetivo demonstrar que o método tem a capacidade em identificar o analito de interesse. A identificação é feita recorrendo a padrões de referência de forma a que as propriedades destes sejam comparáveis com as propriedades da amostra. É necessário garantir que o sinal analítico obtido pelo equipamento corresponde ao analito de interesse. A identificação do analito deve ser possível em matrizes simples e em matrizes com interferentes. [20,21]

### 3.2 Especificidade e Seletividade

A especificidade e a seletividade têm como objetivo definir se o analito pode ser identificado na presença de interferências. A especificidade demonstra que o método tem capacidade de responder apenas ao analito de interesse numa matriz complexa sem existirem interferências. A seletividade, por sua vez, demonstra que o analito de interesse pode ser identificado numa matriz complexa. Para avaliar se existem interferentes recorre-se a ensaios de recuperação. São usadas as mesmas matrizes complexas existindo apenas a variação da concentração do analito ao longo de toda a gama de trabalho. Considera-se que um método é específico e seletivo quando a percentagem de recuperação se encontra dentro dos critérios considerados aceitáveis e pré-estabelecidos pelo laboratório. A percentagem considerada aceite tem por hábito encontrar-se entre 80 e 120% podendo, em alguns laboratórios, encontrar-se entre 90 e 110%. [20,21]

### 3.3 Gráfico Analítico

O gráfico analítico representa a reta de calibração que traduz os dados estatísticos de intersecção, a equação de regressão linear e o coeficiente de correlação. Esta é usada para quantificar o analito em estudo e, para obter resultados precisos, é necessário a utilização de pelo menos 5 pontos sem incluir o zero de forma a não associar eventuais erros. Cada ponto corresponde a um padrão com uma concentração específica que se encontra dentro do intervalo de concentração escolhido para o estudo. Este intervalo de concentração corresponde à faixa entre a menor e a maior concentração de analito que possa ser determinada com precisão e exatidão. [20,21]

Tendo em conta a reta de calibração, podemos afirmar que o sinal instrumental ( $y$ ) está linearmente relacionado com a concentração do padrão ( $x$ ). Esta relação é representada através da seguinte equação:

$$y = mx + b$$

Onde  $y$  representa o sinal obtido pelo instrumento,  $m$  o declive da reta,  $x$  a concentração do analito e  $b$  o coeficiente linear.

### 3.4 Sensibilidade

A sensibilidade avalia a capacidade do método ou do equipamento em identificar pequenas variações na concentração do analito. A sensibilidade da técnica instrumental é identificada e avaliada através do declive da reta de calibração ( $m$ ). A sensibilidade do método analítico é a identificação da diferença mínima entre as concentrações de duas amostras semelhantes com um certo grau de confiança. Esta é obtida através do inverso do desvio padrão da concentração e é expressa através da seguinte equação. [20,21]

$$\text{Sensibilidade} = \frac{m}{s_s}$$

Em que  $m$  representa o declive da reta e  $s_s$  o desvio padrão do sinal analítico correspondente à concentração do analito.

É importante não confundir a sensibilidade com os limites analíticos porque esta corresponde à capacidade de resposta do analito e não à menor concentração de analito possível de detetar.

### 3.5 Testes de Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método e/ou equipamento produzir um sinal que seja diretamente proporcional à concentração do analito dentro de uma determinada gama de trabalho. É comum analisar a linearidade do método através do coeficiente de correlação ( $R^2$ ) que representa a relação entre a sequência de dados e o sinal medido e é expresso através da seguinte equação:

$$R^2 = \frac{\sum_{i=1}^N \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{[\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2 \{ \sum_{i=1}^N (y_i - \bar{y})^2 \}]}}$$

A expressão é formada por conjuntos de pares ordenados independentes,  $(x_1; y_1)$ ;  $(x_2; y_2)$ ; ...;  $(x_i; y_i)$ ; ...;  $(x_N; y_N)$  que correspondem a  $N$  pontos.  $\bar{x}$  representa a média das concentrações e  $\bar{y}$  a média dos sinais instrumentais. [20,21]

Quando o valor do coeficiente de correlação é negativo, estamos perante uma correlação negativa, isto é, o gráfico apresenta um declive negativo. Quando  $R^2=1$  estamos perante uma correlação perfeita com uma correlação positiva, porém, se o valor da correlação estiver perto de 1, isto é,  $R^2 \approx 1$ , este também pode corresponder ao valor que melhor se ajusta para a reta de calibração obtida num determinado estudo. Sendo assim, torna-se importante a visualização da reta de calibração de forma a identificar se existem tendências não lineares dos resultados. [20,21]

### 3.5.1 Teste de Mandel

Segundo a norma ISO 8466-1, a linearidade pode ser avaliada através de um modelo estatístico, o Teste de Mandel. Este modelo avalia se os resultados experimentais conduzem a um melhor ajuste recorrendo a um polinómio de primeiro grau (*P01*) ou a um polinómio de segundo grau (*P02*). Partindo de um conjunto de pares ordenados, obtêm-se a função de calibração linear e a função de calibração não linear e os respetivos desvios-padrão residuais  $S_{y/x}^2$  e  $S_{y^2}^2$ . A partir destes, é calculada a diferença das variâncias ( $DS^2$ ) através da seguinte expressão:

$$DS^2 = (N - 2)S_{\frac{y}{x}}^2 - (N - 3)S_{y^2}^2$$

Em que  $N$  corresponde ao número de padrões utilizados para traçar a reta de calibração. [15,17]

O valor teste ( $VT$ ) é obtido através da seguinte expressão:

$$VT = \frac{DS^2}{S_{y^2}^2}$$

O valor obtido é comparado com o valor tabelado da *distribuição de Fisher* (Anexo 2) permitindo retirar as seguintes conclusões:

- Se  $VT \geq F_{\text{tabelado}}$ , a função de calibração linear conduz a um melhor ajuste dos pontos.
- Se  $VT < F_{\text{tabelado}}$ , a função de calibração linear não conduz a um melhor ajuste dos pontos. A gama de trabalho tem de ser reduzida ou então aplica-se uma função de calibração não linear.

### 3.5.2 Teste das Áreas Normalizadas

O teste das áreas normalizadas é o modelo que tem como objetivo avaliar a linearidade de retas de calibração obtidas através da cromatografia. Este baseia-se na distribuição dos valores normalizados das áreas dos picos cromatográficos. A dispersão das áreas dos picos obtidos pela reta de calibração é avaliada em relação aos valores ótimos de modo a que essa dispersão não seja superior a um intervalo previamente selecionado. Através da função da reta de calibração, estimam-se as áreas dos picos cromatográficos para as concentrações usadas. Para cada uma destas áreas, calcula-se a razão entre o valor experimental e o valor estimado. A concentração para a qual esta razão se aproxima mais de 1 é tomada como referência,  $C_{100}$ , ou seja, corresponde à concentração cujo ponto experimental apresenta uma melhor correlação. [20,21]

A distribuição dos valores normalizados é obtida aplicando, a cada uma das concentrações, a seguinte expressão:

$$\text{Áreas normalizadas} = \frac{A_i/c_i}{A_{100}/c_{100}} \times 100$$

Quando obtidos os valores das áreas normalizadas, representa-se graficamente estes valores *versus* a concentração de cada padrão. Para admitir a existência de linearidade, num determinado intervalo de concentrações, define-se que os valores normalizados não podem ter um desvio superior a uma percentagem específica. Esta percentagem tem por hábito ser 15%, ou seja, os valores normalizados devem estar compreendidos entre 85% e 115%. Sempre que existirem valores normalizados com um desvio superior a 15% deverão ser excluídos reduzindo-se assim a gama de concentrações e aplicando-se novamente o teste até que os resultados sejam satisfatórios. [20,21]

### 3.6 Teste da Gama Analítica

A gama analítica representa o intervalo de concentrações no qual o analito pode ser determinado com linearidade, precisão e exatidão. Para preencher estes requisitos é necessário que a resposta instrumental seja linear e que exista homogeneidade de variância na variável dependente. [20,21]

Segundo a norma ISO 8466-1, é recomendada a utilização de 10 pontos de calibração, e caso não seja aplicável, a reta de calibração deve ser construída recorrendo no mínimo a 5 pontos. [20-22]

O modelo que permite avaliar a gama analítica é o teste da homogeneidade de variâncias. Através deste, é feita a análise do primeiro e último padrão recorrendo a 10 réplicas independentes de forma a existir uma comparação estatística da variância do padrão mais concentrado ( $S_M^2$ ) com a variância do padrão menos concentrado ( $S_m^2$ ) da reta de calibração.

A determinação das variâncias associadas ao padrão com maior concentração e ao padrão com menor concentração,  $S_M^2$  e  $S_m^2$ , são obtidas recorrendo a seguinte expressão:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^{10} (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

Em que:

$$\bar{y} = \frac{\sum_{j=1}^{10} y_{i,j}}{n_i}$$

Para  $i=1$  e  $j=10$ ,  $i$  representa o número do padrão e  $j$  o número de repetições.

As variâncias são testadas de forma a averiguar se existem diferenças entre elas nos limites da gama de trabalho recorrendo à seguinte expressão:

$$TV = \frac{S_M^2}{S_m^2} \quad \text{quando } S_M^2 > S_m^2$$

$$TV = \frac{S_m^2}{S_M^2} \quad \text{quando } S_M^2 < S_m^2$$

Comparando o valor teste com o valor crítico da *distribuição de Fisher* (Anexo 2), para  $n-1$  graus de liberdade, podemos retirar as seguintes conclusões:

- Se  $TV \leq F_{crit}$  : a diferença entre as variâncias não é significativa e a gama de trabalho encontra-se ajustada.
- Se  $TV > F_{crit}$  : a diferença entre as variâncias é significativa e deve-se reduzir a gama de trabalho até se obter  $TV \leq F_{crit}$ .

### 3.7 Limiares analíticos

O limite de deteção ( $LD$ ) e o limite de quantificação ( $LQ$ ) representam os limites inferiores de concentração da curva de calibração possíveis de alcançar com o método de análise. [20,21]

O intervalo entre o limite de deteção e o limite de quantificação representa um intervalo de quantificação semi-quantitativa não podendo ser reportados os valores obtidos nesta zona. O  $LD$  e o  $LQ$  dependem de vários fatores externos como por exemplo, contaminações, laboratório, equipamento e analista: Quando um destes fatores sofre alteração torna-se necessário a reavaliação dos mesmos.

### 3.7.1 Limite de deteção

O limite de deteção corresponde à mais pequena quantidade de analito que pode ser detetada numa amostra. Geralmente, o limite de deteção corresponde ao início de intervalo em que é possível distinguir o sinal do branco do sinal da amostra indicando assim se o analito está presente ou ausente. Este valor, na maioria dos casos, não é considerado como um valor exato devido à existência de erros significativos. [20-22]

O limite de deteção pode ser determinado através de réplicas de brancos ou padrões (entre 10 e 20 réplicas) e da calibração linear recorrendo à seguinte expressão:

$$LD = x_0 + kS_0$$

Em que  $x_0$  representa a média das réplicas de branco ou padrões preparados de forma independente e lidos em dias diferentes,  $S_0$  ao desvio padrão associado a  $x_0$  e por fim, considerando que estamos na presença de uma distribuição gaussiana,  $k$  ao valor da constante da distribuição normal que tem o valor de 3,3 para um nível de confiança de 99,7%.

Outra forma de determinar o limite de deteção é recorrendo à função da curva de calibração através da seguinte expressão:

$$LD = \frac{3.3S_{y/x}}{m}$$

Em que  $S_{y/x}$  representa o desvio padrão residual da curva de calibração e  $m$  o declive.

### 3.7.2 Limite de Quantificação

O limite de quantificação corresponde à menor concentração de analito que pode ser quantificada numa amostra com exatidão e precisão. O  $LQ$  representa o padrão de menor concentração da curva de calibração de um método e, para averiguar a exatidão e precisão deste, é necessário recorrer a uma série de padrões internos cuja concentração esteja próxima ou igual ao limite de quantificação em condições de precisão intermédia. O coeficiente de variação ( $CV$ ) associado não deve exceder os 10%. [20,21]

O limite de quantificação, tal como o limite de deteção, pode ser determinado através de réplicas de brancos ou padrões (entre 10 e 20 réplicas) e da calibração linear recorrendo à seguinte expressão:

$$LQ = x_0 + kS_0$$

Em que  $x_0$  representa a média das réplicas de branco ou padrões preparados de forma independente e lidos em dias diferentes,  $S_0$  o desvio padrão associado a  $x_0$  e por fim, considerando que estamos na presença de uma distribuição gaussiana,  $k$  ao valor da constante da distribuição normal que tem o valor de 10 para um nível de confiança de 99,7%.

O limite de quantificação também pode ser determinado recorrendo à função da curva de calibração usando a seguinte expressão:

$$LD = \frac{10S_{y/x}}{m}$$

Em que  $S_{y/x}$  representa o desvio padrão residual da curva de calibração e  $m$  o declive.

### 3.8 Precisão

A precisão avalia a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos sob a mesma amostra ou padrões em condições previamente definidas, isto é, avalia a capacidade do método em reproduzir os mesmos resultados com concordância aplicando o mesmo procedimento várias vezes em materiais idênticos e em condições definidas. A precisão é avaliada segundo a:

- Repetibilidade;
- Reprodutibilidade;
- Precisão intermédia ou variabilidade entre laboratórios;

A repetibilidade e a reprodutibilidade dependem dos valores de concentração do analito e por isso, é recomendado a utilização de diferentes concentrações para a sua determinação. <sup>[15,17]</sup>

É recomendado recorrer a amostras reais para a determinação da precisão de forma a minimizar o efeito da matriz.

Normalmente, a precisão é avaliada sob a forma de desvio padrão ( $s$ ) através da seguinte expressão:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Ou através do coeficiente de variação (CV) é obtido através da seguinte expressão:

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

### 3.8.1 Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão do método de ensaio fornecer resultados idênticos quando executado sob as mesmas condições operacionais, mesmo laboratório, mesmo analista, mesmo equipamento e os mesmos reagentes num intervalo de tempo reduzido. A repetibilidade é avaliada recorrendo-se a um ensaio interlaboratorial e a materiais de referência internos ou padrões com diferentes concentrações, tendo em consideração toda a gama de trabalho. São necessários no mínimo 10 ensaios. [20,21]

Esta é expressa sob a forma de limite de repetibilidade em que este representa o valor máximo aceite para a diferença absoluta entre dois ensaios em condições de repetibilidade e para um nível de confiança de 95%.

$$R_L = t(v, a)\sqrt{2} \times S_r$$

Onde  $v$  representa o número de réplicas necessárias para determinar o desvio padrão  $S_r$  que se refere à repetibilidade estimada por  $t(v, a)$  que corresponde ao valor crítico da distribuição de *t-student* com um nível de confiança de 95% e com  $v-1$  graus de liberdade.

Caso a amplitude entre os dois ensaios seja superior ao limite de repetibilidade, é aconselhável fazer uma segunda análise crítica e recorrer à repetição do ensaio segundo os dados bibliográficos e as normas.

É necessário determinar o coeficiente de variação de repetibilidade (CV), que numericamente, é igual à razão entre o desvio padrão  $S_r$  e à média dos resultados obtidos  $\bar{x}$ . O valor de CV não pode ser superior a 10% e este é expresso por:

$$CV = \frac{S_r}{\bar{x}} \times 100$$

### 3.8.2 Reprodutibilidade

A reprodutibilidade exprime a precisão de um método quando este é sujeito a condições experimentais diferentes. As condições a variar são:

- Diferentes analistas;
- Diferentes laboratórios;

- Diferentes equipamentos;
- Diferente intervalo de tempo;

O valor referente à variância da reprodutibilidade é expresso por:

$$S_{Rj}^2 = S_0^2(w) + S_{Lj}^2$$

$S_0^2(w)$  corresponde à média das variâncias interlaboratorial e é expressa por:

$$S_0^2(w) = \frac{\sum_{i=1}^p S_i^2}{p}$$

Em que  $S_i^2$  representa as variâncias independentes de cada laboratório e  $p$  o número de laboratórios.

$S_{Lj}^2$  corresponde à variância associada ao laboratório e é expressa por:

$$S_{Lj}^2 = \frac{S_0^2(b) - S_0^2(w)}{n}$$

Em que  $S_0^2(b)$  é dado por:

$$S_0^2(b) = \frac{n \times \sum_{i=1}^p (y_i - y_m)^2}{p - 1}$$

$p$  representa o número de laboratórios e  $\sum_{i=1}^p (y_i - y_m)^2$  representa a soma das variâncias das repetições de ensaio.

O limite de reprodutibilidade corresponde ao valor máximo aceite para representar a diferença absoluta entre dois ensaios em condições de reprodutibilidade para um nível de confiança de 95% e é obtido através de:

$$R_L = t(v, a)\sqrt{2} \times S_r$$

Onde  $v$  representa o número de réplicas necessárias para determinar o desvio padrão  $S_r$  que se refere à repetibilidade estimada por  $t(v, a)$  que corresponde ao valor crítico da distribuição de *t-student* com um nível de confiança de 95% e com  $v-1$  graus de liberdade.

[15,17]

### 3.8.3 Precisão intermédia

A precisão intermédia, ou variabilidade intralaboratorial, exprime a precisão do método utilizando a mesma amostra dentro do mesmo laboratório, mas variando o equipamento e o analista em intervalos de tempo diferentes. A sua determinação é feita com base em cartas

de controlo de amplitude devido aos ensaios serem executados em dias diferentes, o que leva a uma considerável variação aleatória dos parâmetros experimentais não controlados que afetam o desempenho do método. [20,21]

O desvio padrão relativo da precisão intermédia obtido tendo em conta  $t$  padrões é expresso por:

$$S_{\text{precisão}} = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{i,k} - \bar{y}_j)^2}{t(n-1)}}$$

Em que  $n$  representa o número de réplicas,  $y_{i,k}$  o resultado replicado  $k$  vezes (entre 1 e  $n$ ) do padrão  $j$  (entre 1 e  $t$ ) e  $\bar{y}_j$  a média aritmética dos resultados de  $n$  ensaios realizados sobre o padrão  $j$ . O termo  $t(n-1)$  tem de possuir um valor superior a 15. [20,21]

### 3.9 Robustez

A robustez corresponde à capacidade de o método produzir o mesmo resultado quando sujeito a pequenas alterações como, variação da temperatura,  $pH$  e composição de uma mistura de solventes. É avaliada recorrendo ao teste de *Youden* que consiste em executar um determinado número de ensaios sobre uma amostra tendo em conta que, em segundo plano, são controlados um certo número de fatores (máximo sete) de forma a verificar a sua influência no processo. Quanto maior a robustez, maior a confiança em relação à precisão do método. [15,17]

### 3.10 Teste de Grubbs para a avaliação numérica de dados não conciliáveis

#### 3.10.1 Observação de um resultado:

Dado um conjunto de resultados  $y_i$  ( $i=1,2,\dots,p$ ) ordenados por ordem crescente, o resultado mais afastado deve ser avaliado como um resultado não conciliável através do teste de Grubbs. No caso do resultado observado ser o de valor máximo, o parâmetro de Grubbs é caracterizado por:

$$G_{ij} = \frac{(y_{\text{máx.}} - y_{\text{mm}})^2}{S_{ij}}$$

Em que:

$$S_{ij} = \sqrt{\frac{1}{p-1} \times \sum_{j=1}^p (y_m - y_{mm})^2}$$

No caso do resultado observado ser o de valor mínimo, o parâmetro de Grubbs é caracterizado pela mesma equação acima indicada, mas tendo em consideração o valor mínimo.

Os valores obtidos,  $G_{exp}$ , são então posteriormente comparados com um valor tabelado,  $G_{tab}$ . Se  $G_{exp} \geq G_{tab}$  existem *outliers* e os resultados não são coerentes a um nível de confiança de 95%. Se  $G_{exp} < G_{tab}$  não existem *outliers* e os resultados são coerentes, o laboratório é aceite.

### 3.10.2 Observação de dois resultados:

Os dois resultados mais afastados podem ser avaliados, simultaneamente, como resultados não conciliáveis. No caso de os resultados serem de valor máximo, o parâmetro de Grubbs é caracterizado por:

$$G_{ij} = \frac{S_{p-1,p}^2}{S_0^2}$$

Em que:

$$S_0^2 = \sum_{i=1}^p (y_{ij} - y_{mm})^2 \quad \text{e} \quad S_{p-1,p}^2 = \sum_{i=1}^{p-2} (y_{ij} - y_{p-1,p})^2$$

Para os resultados de valor mínimo o parâmetro de Grubbs também é caracterizado por esta equação, mas tendo em conta os valores mínimos.

Os valores obtidos,  $G_{exp}$ , são então, posteriormente, comparados com um valor tabelado,  $G_{tab}$ . Se  $G_{exp} \geq G_{tab}$  não existem *outliers* e os resultados são coerentes, o laboratório é aceite. Se  $G_{exp} < G_{tab}$  existem *outliers* e os resultados não são coerentes a um nível de confiança de 95%.

## 4. Controlo Químico de Qualidade

O conceito de qualidade representa a satisfação do cliente e a garantia de resultados fiáveis, por isso, após a validação de um método torna-se necessário garantir que as condições de validade se mantêm. O controlo químico de qualidade é avaliado através de análises químicas de rotina. Estas análises químicas rotineiras podem conter erros aleatórios e/ou sistemáticos que afetam o resultado e, para garantir a fiabilidade do valor final, é necessário minimizar as fontes de erros através da Garantia de Qualidade (GQ) e controlar a sua ocorrência através do Controlo de Qualidade (CQ) de modo a melhorar a eficácia do Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ). Os resultados necessitam de verificações periódicas sobre a sua exatidão e para tal, recorre-se ao Controlo de Qualidade Interno (CQI) e ao Controlo de Qualidade Externo (CQE). [22]

### 4.1 Sistema de Controlo Interno (SCI)

O controlo de qualidade interno de um laboratório corresponde às análises de rotina que são efetuadas à medida que as análises são executadas. As ferramentas utilizadas para o controlo de qualidade Interno são as seguintes:

- Calibração de equipamentos analíticos;
- Materiais de referência internos;
- Análise de Brancos;
- Análise de Duplicados;
- Amostras cegas;
- Cartas de Controlo;
- Ensaio de recuperação;

#### 4.1.1 Calibração de equipamentos analíticos

A calibração analítica é feita periodicamente ou sempre que o fabricante, ou o laboratório, achar necessário. Esta é feita recorrendo a uma curva de calibração com um número definido de pontos em que os limites inferiores e superiores da gama de trabalho estão incluídos. A sua eficiência é analisada recorrendo ao coeficiente de correlação (linearidade) e ao declive da reta (estabilidade/sensibilidade). [22]

### 4.1.2 Análise de Brancos

Um branco representa a matriz da amostra sem o analito em estudo. Este tipo de análise permite verificar se existem contaminações ou a deterioração da amostra e averiguar os limites de quantificação e de deteção. É recomendado recorrer à análise de brancos quando se alteram os reagentes ou o material utilizado de forma a verificar se estão a ser introduzidas contaminações na amostra. [22]

### 4.1.3 Análise de Duplicados

A análise de duplicados permite averiguar se existem erros acidentais durante o processo de análise e permite controlar a repetibilidade do método utilizado. É recomendado recorrer à análise de duplicados quando o processo de análise é complexo e prolongado, e quando a amostra é de difícil homogeneização. Para avaliar os duplicados recorre-se à diferença relativa (*DR*) expressa por:

$$DR (\%) = \frac{A - D}{\bar{X}} \times 100$$

Em que *A* representa o valor obtido pela análise da amostra, *D* o valor obtido pela análise do duplicado e  $\bar{X}$  a média aritmética dos dois resultados.

### 4.1.4 Amostras cegas

As amostras cegas têm como objetivo avaliar o desempenho dos analistas uma vez que o teor destas amostras apenas é revelado ao responsável técnico da qualidade do laboratório. Os resultados obtidos, para um dado método, são considerados aceites quando a diferença entre o resultado obtido e o valor aceite como verdadeiro é inferior à precisão intermédia obtida através do referente método. [22]

### 4.1.5 Cartas de Controlo

A carta de controlo representa uma comparação gráfica cronológica dos resultados de uma amostra com os limites que identificam a variabilidade dentro da qual esse resultado pode oscilar quando a análise química é executada em condições normais. Através das cartas de controlo é possível distinguir os erros sistemáticos dos erros aleatórios facilitando assim, uma indicação sobre se o problema deve ser corrigido através de uma ação imediata ou se

requer uma ação mais ponderada. É criada uma linguagem comum sobre o comportamento do analista e dos diferentes laboratórios. [22]

Executam-se cartas de controlo de:

- **Média ou Indivíduos (X):** Representa o comportamento do processo químico em relação aos valores das variáveis;
- **Amplitude (R) e Desvio padrão (σ):** Representa o comportamento da dispersão do processo;

As cartas de controlo possuem diferentes limites que permitem averiguar se o processo está sob controlo. O limite de controlo central (*LC*) representa o valor mais provável, o limite de controlo superior (*LS*) e o limite de controlo inferior (*LI*) representam os limites de confiança estabelecidos a 99%. O limite de controlo de aviso superior (*LAS*) e o limite de controlo de aviso inferior (*LAI*) representam os limites de confiança estabelecidos a 95%.

Limite de controlo superior:  $LS = \bar{X} + 3s$

Limite de aviso superior:  $LAS = \bar{X} + 2s$

Limite de controlo:  $LC = \bar{X}$

Limite de aviso inferior:  $LAI = \bar{X} - 2s$

Limite inferior:  $LI = \bar{X} - 3s$

Onde  $\bar{X}$  representa a média e *s* o desvio padrão.

A seleção da carta de controlo deve ser efetuada tendo em conta as características a controlar e as ações de controlo adotadas.

#### 4.1.6 Ensaio de recuperação

A recuperação reflete a quantidade de analito recuperada face à quantidade real presente na amostra. Este tipo de ensaio tem como finalidade identificar a viabilidade do método em diferentes matrizes que correspondem a amostras reais. A fortificação é a adição de uma solução com concentração conhecida à amostra de forma a aumentar a concentração de analito na mesma. [22]

Após a fortificação procede-se à recuperação que consiste na verificação de efeitos sistemáticos introduzidos devido ao efeito da matriz. Este efeito deve-se à presença de interferentes que podem causar o aumento ou a diminuição do sinal analítico. Para indicar a

eficácia com que um analito introduzido numa amostra é recuperado recorre-se à percentagem de recuperação que é expressa por:

$$\%Rec = \frac{C_t - C_i}{C_f} \times 100$$

Onde  $C_t$  representa a quantidade total de analito presente na amostra após a fortificação,  $C_i$  a quantidade de analito presente na amostra antes da fortificação e  $C_f$  a quantidade de analito adicionado durante a fortificação.

Em termos de aceitação, é comum que a percentagem de recuperação se encontre entre 80-120%.

## 4.2 Sistema de Controlo Externo (SCE)

O sistema de controlo de qualidade externo visa avaliar a exatidão de um determinado método recorrendo a valores obtidos externamente através de ensaios interlaboratoriais e de materiais de referência certificados.

### 4.2.1 Ensaios Interlaboratoriais

Os ensaios interlaboratoriais permitem a comparação entre os resultados obtidos pelo laboratório e o valor aceite como verdadeiro. Estes são de extrema importância no controlo de qualidade externo porque asseguram a qualidade dos resultados obtidos pelo método. Estes podem ser de vários tipos, tendo em conta o objetivo da análise:

- **Ensaio interlaboratorial de aptidão:** tem como função avaliar o desempenho dos laboratórios participantes que tem como liberdade escolher o método que preferirem. Os ensaios de aptidão são usualmente usados quando o objetivo é evidenciar a exatidão dos resultados.<sup>[21] [22]</sup>
- 
- **Ensaio interlaboratorial de normalização:** tem como função estudar as características do método (reprodutibilidade e repetibilidade). Os ensaios de normalização são usualmente usados quando o objetivo é demonstrar a repetibilidade e reprodutibilidade do método que, em simultâneo, evidencie a sua precisão em relação a outros laboratórios.<sup>[21] [22]</sup>

O fator de desempenho “z-score” permite avaliar o desempenho obtido pelo laboratório tendo em conta o resultado obtido pelo método em estudo ( $X_{tab}$ ), o resultado aceite como

verdadeiro ( $X_v$ ) e o desvio-padrão entre os resultados obtidos por todos os laboratórios participantes no ensaio interlaboratorial ( $s$ ). Este é expresso por:

$$Z = \frac{(X_{tab} - X_v)}{s}$$

O desempenho do “z-score” pode ser avaliado da seguinte forma:

- $|Z| \leq 2$  : *Desempenho satisfatório*
- $2 < |Z| < 3$  : *Desempenho questionável*
- $|Z| \geq 3$  : *Desempenho incorreto*

#### 4.2.2 Materiais de referência certificados

Os materiais de referência certificados (*MRC*) são materiais cuja concentração é conhecida e associada a uma incerteza com valor conhecido. Estes materiais são de extrema importância para a química analítica porque permitem a calibração de equipamentos de análise e fornecer resultados confiáveis durante processos de validação e implementação de métodos analíticos, como também, em testes de controlo de qualidade quotidianos. Segundo a NP EN ISO/IEC 17025, os *MRC* têm de ser preparados por entidades reconhecidas que têm a capacidade de fornecer os seus valores certificados com as respetivas incertezas. <sup>[22]</sup>

Quando se recorre à utilização de um *MRC*, o valor deste deve ser comparado com o valor certificado determinando-se assim o erro e a exatidão da análise. Se o valor obtido não for satisfatório, o laboratório deverá identificar as causas de forma a eliminá-las. Os resultados obtidos através da análise de um *MRC* podem ser analisados recorrendo aos seguintes processos:

- Erro relativo;
- Teste de hipóteses (*t-test*);
- Fator de desempenho (*z-score*);
- Erro normalizado;

## **Capítulo III**

Ácidos  $\alpha$ ,  $\beta$  e humulinonas por HPLC  
Metodologia

# 1.Princípio do método

A implementação e a validação da análise de ácidos  $\alpha$ , ácidos  $\beta$  e humulinonas por HPLC baseia-se numa readaptação de um método inicial “*Dosage des acides alfa, des acides iso-alpha et des acides tetra-hydro-iso alfa par HPLC*” implementado pela cervejaria *Kronenbourg*.<sup>[23]</sup> Este método foi escolhido pela *Super Bock Group* por possuir semelhanças com o método da *Convenção Europeia do Fabrico de Cervejas* (EBC).<sup>[16]</sup>

A seguinte metodologia consiste num reajuste do método acima indicado. Foram realizadas alterações devido à presença de problemas técnicos (ver resultados e discussão). Os principais compostos responsáveis pelo sabor amargo da cerveja, como apresentado no capítulo anterior, são derivados do lúpulo e são denominados por ácidos  $\alpha$ , ácidos  $\beta$  e humulinonas.

Para proceder à validação do método foram escolhidos quatro padrões que na sua constituição possuíssem os principais isómeros das três classes de compostos de interesse (Tabela 2). As informações mais detalhadas sobre cada padrão estão apresentadas no **Anexo 1**.

*Tabela 2: Identificação dos padrões usados para validar o método de quantificação dos compostos responsáveis pelo amargor por HPLC.*

Denominação do padrão	Composto de origem	Isómeros presentes
ICS Hum-1	Humulinonas	Co-Humulinona
		n-Humulinona
		Ad-Humulinona
ICS-I4	Ácidos $\alpha$	Isocohumulona
		Isohumulona
		Isoadhumulona
ICS-T3	Ácidos $\alpha$	Tetra-isohumulona trans
		Tetra-isohumulona cis
		Tetra-isohumulona
		Tetra-isoadhumulona
ICE-3	Ácidos $\alpha$	Cohumulona
		n + Adhumulona
	Ácidos $\beta$	Colupulona
		n + Adlupulona

O método consiste em quantificar estes compostos através da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a utilização de uma coluna cromatográfica em fase reversa e um detetor UV a um comprimento de onda de 270 nm. Foi escolhida uma coluna C<sub>18</sub> devido a esta possuir uma fase estacionária apolar e por o seu ligante possuir uma elevada estabilidade e compatibilidade com a maioria dos compostos orgânicos. As escolhas destes parâmetros têm em conta o indicado pela *Convenção Europeia do Fabrico de Cervejas* (EBC). [16]

A concentração de cada analito é obtida recorrendo ao método da curva de calibração. Como cada composto apresenta mais do que um pico cromatográfico é necessário recorrer ao somatório de todos os picos de cada analito de forma a obter-se o amargor total e a respetiva curva de calibração.

Um exemplo de cromatograma contendo os quatro padrões está representado na Figura 13.

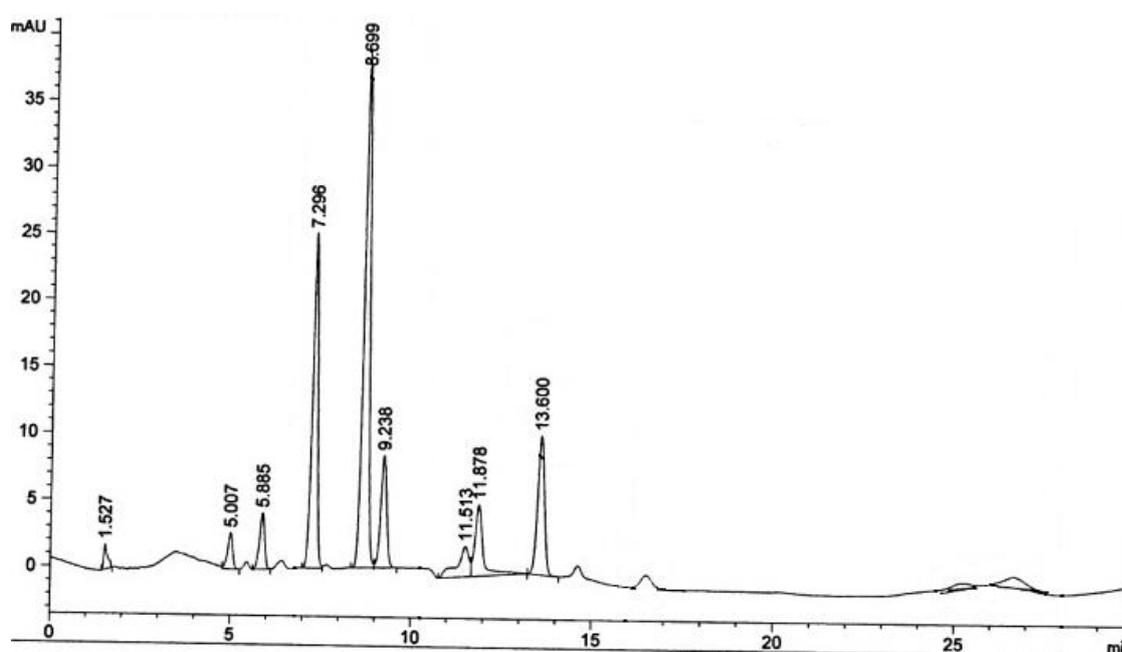


Figura 13: Cromatograma com todos os compostos responsáveis pelo amargor da cerveja (Humulinonas, ácidos  $\alpha$  e ácidos  $\beta$ )

Na Tabela 3 encontram-se informações mais detalhadas sobre o cromatograma, como por exemplo, a identificação de cada pico e o respetivo tempo de retenção. É possível verificar que existe uma sobreposição de picos porque os tetra-hidro-iso- $\alpha$  e os ácidos  $\alpha$  possuem os mesmos tempos de retenção. De modo a possibilitar a quantificação de todos os picos e os respetivos valores de concentração é elaborada uma curva de calibração com ICS-14 e ICE-3 e outra com ICS-T3.

Tabela 3: Identificação de cada pico correspondente ao seu composto de origem do cromatograma

Composto		Tempo de retenção (min.)
ICS Hum-1	Co-humulona	5,0
	n-humulona	5,9
	Ad-humulona	6,4
ICS-I4	Iso-co-humulona	7,3
	Iso-humulona	8,7
	Iso-ad-humulona	9,3
ICS-T3	Tetra-iso-humulona trans	11,5
	Tetra-iso-humulona cis	11,9
	Tetra-iso-humulona	13,6
	Tetra-iso-adhumulona	14,6
ICE-3	Co-humulona	13,6
	n + Adhumulona	16,6
	Co-lupulona	25,2
	n + Adlupulona	26,9

As cervejas normalmente, não apresentam tetra-iso-humulona e co-humulona simultaneamente e, por isso, esta sobreposição não irá afetar o resultado. Caso ambos os isômeros estejam presentes é feita a adição de 0,1 mg/L ao valor da concentração final. Este valor representa uma estimativa de concentração sobreposta, isto é, do valor total de concentração obtida, 0,1 mg/L corresponde à concentração “perdida” de Tetra-iso-humulona devido à sobreposição de picos (razão implementada pela *Kronenbourg*).

## 2.Reagentes e materiais utilizados

Tabela 4: Reagentes utilizados para a implementação do método de quantificação de ácidos  $\alpha$ , ácidos  $\beta$  e humulinonas por HPLC

Reagente	Marca
Água millipore	MilliQGradient/Merck
Metanol (99,4%)	Merck
Ácido fosfórico (85%, d=1,71) – H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck
EDTA Titriplex	Merck

Tabela 5: Padrões utilizados para a implementação do método de quantificação de ácidos  $\alpha$ , ácidos  $\beta$  e humulinonas por HPLC

Padrão	Constituição	Marca
ICE-3	Extrato de lúpulo com uma percentagem conhecida de ácidos $\alpha$ e $\beta$	Labor Veritas
ICS-I4	Preparação de ácidos-iso- $\alpha$ num sal de DCHA (d ciclohexilamina)	Labor Veritas
ICS-T3	Preparação purificada de ácidos tetra-hidro-iso- $\alpha$ (contém os dois isómeros)	Labor Veritas
ICS Hum-1	Humulinona	Labor Veritas

Tabela 6: Material utilizado para a implementação do método de quantificação de ácidos  $\alpha$ , ácidos  $\beta$  e humulinonas por HPLC

Material	Marca
Cromatógrafo de HPLC	Agilent 1100 infinity
Coluna cromatográfica	Hichrom 3,5 C18. 15 cm x 4,6 mm
Balança analítica	Mettler Toledo
Bomba de vácuo	KNF
Banho ultrassons	P Selecta
Pipeta gradual de 20 mL	Linex/VWR
Balões volumétricos de 25 e 50 mL	Linex/VWR
Filtro de membrana com 0,45 $\mu$ m	Linex/VWR

### 3.Preparação fase móvel

- **Fase móvel A: Metanol puro (99,9%)**

A fase movel A é preparada colocando metanol puro dentro de um frasco e deixando 10 minutos no banho ultrassons.

- **Fase móvel B: 70% Metanol: 20% Água**

A fase móvel B consiste em misturar 725 mL de metanol com 265 mL de água e 20 mL de ácido ortofosfórico. Esta mistura é homogeneizada recorrendo à agitação magnética (aprox. 10 minutos) e filtrada com recurso a vácuo e um filtro de solventes de 0,45 µm. No final, procede-se à adição de 0,75 mL de EDTA 0,1 M. Desarejar a solução recorrendo a um banho de ultrassons. (Fase móvel apresentada na ficha informativa do padrão ICS Hum-1) <sup>[23]</sup>

### 4.Preparação das soluções padrão

Os padrões são diluídos em metanol acidificado que consiste em 1 L de metanol com a adição de 0,135 mL de ácido ortofosfórico.

#### **ICE-3: Preparação de uma solução com concentração de 100 mg/L (44,64%)**

1. Pesar rigorosamente 0,0112 g para um gobelé de 40 mL.
2. Considerando a viscosidade da amostra é necessário homogeneizá-la através de uma espátula antes de se proceder à pesagem.
3. Adicionar metanol acidificado à amostra e dissolver o padrão recorrendo a um banho ultrassons (importante tapar o gobelé de forma a evitarem-se perdas).
4. Transferir quantitativamente a solução para um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume.

#### **ICS-I4: Preparação de uma solução com concentração de 1000 mg/L (65,2%)**

1. Pesar rigorosamente 0,0812 g para um gobelé de 40 mL.
2. Adicionar metanol acidificado e dissolver a amostra recorrendo à agitação magnética.
3. Transferir quantitativamente a solução para um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume.

### ICS-T3: Preparação de uma solução com concentração de 300 mg/L (99,4%)

1. Pesar rigorosamente 0,0151 g para um gobelé de 40 mL.
2. Adicionar metanol acidificado e dissolver a amostra recorrendo à agitação magnética.
3. Transferir quantitativamente a solução para um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume.

NOTA: Esta solução só é estável durante 3h.

### Hum-1: Preparação de uma solução com concentração de 150 mg/L (65,6%)

1. Pesar rigorosamente 0,0076 g para um gobelé de 40 mL.
2. Adicionar metanol acidificado e dissolver a amostra recorrendo à agitação magnética.
3. Transferir quantitativamente a solução para um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume.

**NOTA:** As massas a pesar foram calculadas tendo em conta a pureza de cada padrão. Caso os padrões apresentem purezas diferentes das mencionadas deve-se proceder a novos cálculos.

O volume necessário a retirar das respetivas soluções-mãe de modo a obter as diluições necessárias para as soluções-padrão encontram-se na Tabela 7. As diluições são feitas num balão volumétrico de 25 mL.

*Tabela 7: Volume necessário a retirar das respetivas soluções-mãe de modo a obter as diluições necessárias para as soluções-padrão*

Padrão	HUM-1		ICE-3		ICS-I4		ICS-T3	
	Concentração (mg/L)	V (µL)						
P1	5	125	0,5	125	5	125	1,5	125
P2	10	250	1	250	10	250	3	250
P3	15	375	1,5	375	15	375	4,5	375
P4	20	500	2	500	20	500	6	500
P5	25	625	2,5	625	25	625	7,5	625
P6	30	750	3	750	30	750	9	750
P7	40	1000	4	1000	40	1000	12	1000

## 5. Técnica

### 5.1 Condições cromatográficas

- Temperatura da amostra (Vial): 4°C
- Temperatura coluna: 40°C
- Comprimento de onda do detetor: 270 nm
- Volume de injeção: 15 µL
- Tempo de análise: 25 minutos
- Fluxo da fase móvel: 1,0 mL/min

Tabela 8: Método para análise de humulinonas, ácidos  $\alpha$  e ácidos  $\beta$

Tempo (min.)	B(%)	C(%)	Fluxo (mL/min.)	Pressão máxima (psi)
0,00	80	20	1	300
12,00	75	25	1	300
14,50	80	20	1	300
17,50	75	25	1	300
22,00	80	20	1	300
25,00	80	20	1	300

É importante deixar estabilizar o equipamento durante aproximadamente 30 minutos. O eluente B representa a mistura metanol (70%) e o eluente C o metanol puro.

### 5.2 Preparação de amostras de cerveja

A preparação de uma amostra de cerveja consiste na desgaseificação e filtração da mesma. Durante este processo é de extrema importância garantir que não ocorreram perdas de espuma e para tal a amostra é arrefecida a 4 °C e adicionado uma gota de octanol. <sup>[23]</sup>

A amostra deve ser filtrada com uma membrana de 20 µm antes de ser inserida no vial e feita a sua leitura. <sup>[23]</sup>

## **Capítulo IV**

Ácidos  $\alpha$ ,  $\beta$  e humulinonas por HPLC  
Resultados e Discussão

# 1. Resolução do desvio na linha de base do cromatograma

O objetivo inicial do estágio consistia em utilizar o método implementado na *Super Bock Group* para dois outros compostos de interesse, as humulinonas e o xantohumol. Estes dois compostos, também derivados do lúpulo, possuem uma elevada importância no amargor em cervejas por *dry-hopping*. No primeiro cromatograma do projeto verificou-se a presença de uma lomba na linha de base que não permitia quantificar os compostos desejados (Figura 14).

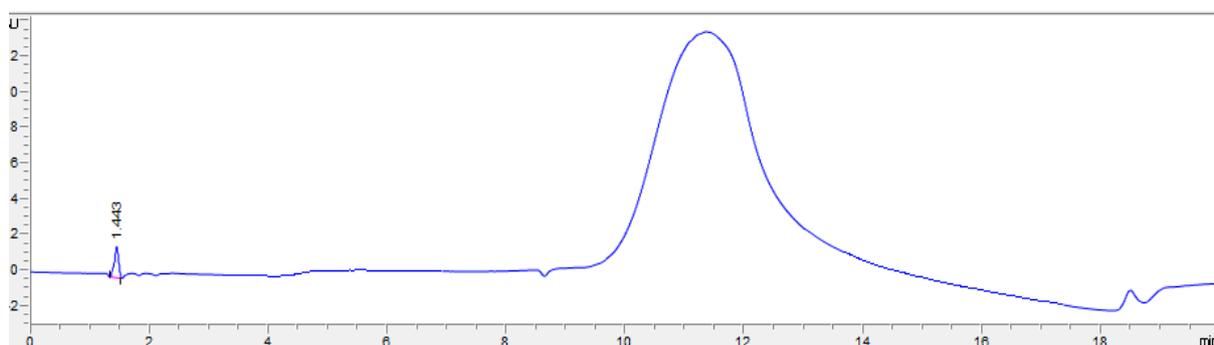


Figura 14: Injeção de água ultrapura com o método usado para analisar humulinonas. O esperado seria uma linha de base constante, mas, contrariamente, foi obtida uma lomba fantasma nos tempos de retenção entre 10 e 18 min.

A primeira etapa de resolução do problema consistiu em testar os eluentes de forma a verificar se o problema tinha origem na bomba de mistura ou na preparação dos mesmos. Para tal foram feitos os seguintes testes:

1. Preparação de novos eluentes;
2. Testou-se o fluxo dos diferentes canais da fase móvel (A,B,C e D) nas seguintes condições:
  - Fluxo canal A;
  - Fluxo canal B;
  - Fluxo canal C;
  - Fluxo canal D;
  - Fluxo da mistura B e C,
  - Fluxo da mistura C e D;

Durante todos estes testes, foram injetadas amostras puras em que o resultado deveria ser uma linha de base constante, mas, a lomba continuava presente em todos os casos. Foi então decidido inverter a coluna cromatográfica. Considerando que, como foram

injetadas amostras de cerveja sem a utilização de pré-coluna e sem uma filtração prévia, o problema deveria ser uma contaminação da coluna. A coluna foi invertida respeitando todos os processos requeridos para o mesmo e o problema persistiu.

O equipamento também é usado para a análise de ácido sórbico e o método de análise deste composto é feito em modo isocrático com uma coluna diferente. Foi analisado ácido sórbico e não ocorreu nenhum desvio e concluiu-se então que o problema provinha da coluna e não do equipamento e procedeu-se à compra de uma nova coluna. A mesma foi inserida no equipamento respeitando todos os processos. Procedeu-se ao teste da nova coluna e, apesar de possuir um tamanho mais reduzido, a lombra continuava presente não possibilitando a iniciação da validação do método de quantificação de humulinonas e xantohumol.

Como acima referido, a análise de ácido sórbico não apresentou desvios e os fatores que diferem das duas análises são, o tipo de eluentes, o tipo de eluição e a coluna. Considerou-se então que o equipamento apresentava problemas na bomba de mistura e que a presença de um técnico seria requerida.

A manutenção pelo técnico da *Agilent* não foi conclusiva e, segundo ele, o equipamento não apresentava nenhum problema uma vez que o problema provinha do método. Foi então testado e alterado o gradiente do método com o objetivo de se obter uma linha de base contínua. Na Tabela 9 encontra-se representado o gradiente do método da cervejaria *Kronenbourg*, o método inicialmente validado na *Super Bock Group*.

Tabela 9: Gradiente do método “*Dosage des acides alfa, des acides iso-alpha et des acides tetra-hydro-iso alfa par HPLC*” implementado pela cervejaria *Kronenbourg*

Tempo (min.)	B(%)	C(%)	Fluxo (mL/min.)	Pressão máxima (psi)
<b>0,00</b>	80	20	1	300
<b>14,16</b>	20	80	1	300
<b>15,75</b>	20	80	1	300
<b>16,54</b>	80	20	1	300
<b>18,00</b>	80	20	1	300
<b>19,00</b>	5	95	0,2	300

O eluente B representa o solvente com 70% fase orgânica e o eluente C o solvente com 100% fase orgânica. As alterações no gradiente, utilizando as mesmas percentagens de fase orgânica, estão apresentadas na Tabela 8. Este gradiente não possui a presença de lombra na linha de base e permite identificar e quantificar todos os compostos com a mesma eficiência do método inicial. Como foram alterados parâmetros, tornou-se necessário repetir a validação do método para ácidos  $\alpha$  e ácidos  $\beta$ . Assim, o tema do projeto foi alterado e focou-se em repetir a validação destes ácidos inserindo as humulinonas.

## 2. Resultados da validação

Foram analisados quatro padrões, o ICS Hum-1, referente às humulinonas, o ICS-I4 referente aos ácidos iso- $\alpha$ , o ICS-T3 referente aos tetra-hidro-iso- $\alpha$  ácidos e o ICE-3 referente aos ácidos  $\alpha$  e ácidos  $\beta$ . As gamas de trabalho para cada padrão foram pré-definidas pela *Super Bock Group* e estão apresentadas na Tabela 10.

Tabela 10: Gama de trabalho dos respectivos padrões escolhida para o presente projeto em mg/L

Padrão	Gama de trabalho (mg/L)
ICS Hum-1	5 - 40
ICS-I4	5 - 40
ICS-T3	5 - 40
ICE-3	0,5 - 4

### 2.1. Sensibilidade

Tratando-se de um modelo linear, a sensibilidade é constante ao longo de toda a gama de trabalho correspondendo assim ao declive da reta de calibração. A sensibilidade foi avaliada tendo em conta as retas de calibração de cada padrão. Na Tabela 11 encontram-se as retas de calibração obtidas com o respetivo coeficiente de correlação e declive.

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) traduz a linearidade entre os valores obtidos ao longo da reta de calibração. Os valores do declive correspondem ao valor da sensibilidade de cada padrão. (ver 3.4 do capítulo 2)

Tabela 11: Declive obtido para cada reta de calibração referente a cada padrão com o respetivo coeficiente de correlação e equação da reta de calibração

Composto	Declive (m)	Coeficiente de Correlação (R)	Equação da reta de calibração
ICS Hum-1	2,71	0,99	$y = 2,7125x - 2,3295$
ICS-I4	27,21	0,99	$y = 27,209x - 9,9588$
ICS-T3	24,71	0,99	$y = 24,709x + 1,1066$
ICE-3	19,66	0,99	$y = 19,659x - 2,9508$

## 2.2. Testes de Linearidade da curva de calibração

Para testar a linearidade das curvas de calibração foram aplicados o teste de Mandel e o teste das áreas normalizadas (mais adequado para análises cromatográficas). O Teste de Mandel consiste na comparação dos ajustes dos valores experimentais obtidos com um polinómio de grau 1 ( $P01$ ) e com um polinómio de grau 2 ( $P02$ ). (ver 3.5.1 do capítulo 2)

O teste das áreas normalizadas representa graficamente os valores normalizados *versus* a concentração do analito. Para admitir a existência de linearidade, num determinado intervalo de concentração, define-se previamente que os valores normalizados não podem ter um desvio superior a uma dada percentagem, como por exemplo 15%, ou seja, deverão estar compreendidos entre 85 e 115%. (ver 3.5.2 do capítulo 2)

### 2.2.1. ICS Hum-1

- **Teste de Mandel**

Tabela 12: Valores das variâncias da curva de calibração de grau 1 e da curva de calibração de grau 2 para o padrão ICS Hum-1

<b><math>S_{Y/x(1)}</math></b>	2,72
<b><math>S_{Y/x(2)}</math></b>	2,05

Tabela 13: Resultados do teste de Mandel para o padrão ICS Hum-1: o valor da diferença de variância, o valor teste e o valor tabelado da distribuição de Fisher (Anexo 2)

<b><math>DS^2</math></b>	5,38
<b>VT</b>	2,62
<b><math>F_{crit}</math></b>	18,51

Segundo o teste de Mandel assume-se duas hipóteses, a hipótese nula ( $H_0$ ) que assume que  $VT \leq F_{crítico}$ , e a hipótese alternativa ( $H_1$ ) que assume que  $VT > F_{crítico}$ . Por observação da tabela 13, verifica-se que o valor de  $VT$  é inferior ao valor de  $F_{crítico}$  e que a hipótese nula ( $H_0$ ) é aceite. Assim, o modelo de polinómio de grau 1 ( $P01$ ) apresenta melhor ajuste uma vez que possui maior número de graus de liberdade. Sendo o modelo  $P01$  mais linear, concluímos que a reta de calibração do padrão ICS Hum-1 apresenta linearidade e pode ser usada para quantificar humulinonas.

- **Teste das Áreas Normalizadas**

Tabela 14: Valores do sinal analítico normalizados para o padrão ICS Hum-1.

Padrão	Sinal Teórico (UA)	Concentração (mg/L)	Sinal Obtido (UA)	Sinal Normalizado (UA)
P1	11,2	5	12,2	88,8
P2	24,8	10	25,9	94,3
P3	38,4	15	39,5	95,8
P4	51,9	20	49,9	90,8
P5	65,5	25	64,3	93,6
P6	79,1	30	75,3	91,4
P7	106,2	40	109,9	100

Através dos resultados da Tabela 14 torna-se possível obter o gráfico na Figura 16 e observar os sinais normalizados compreendidos entre 85% e 110%.

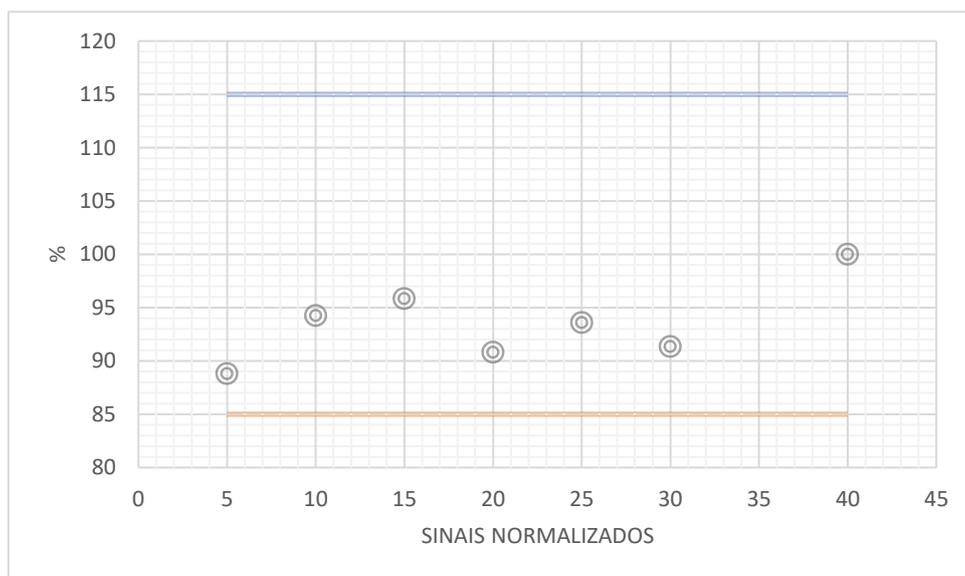


Figura 16: Representação gráfica dos sinais normalizados do padrão ICS Hum-1 para o teste das áreas normalizadas

Para existir linearidade nos resultados todos os valores dos sinais normalizados têm de estar compreendidos entre 85% e 115%. Apesar de estes valores se encontrarem dispersos entre si, estes encontram-se dentro do intervalo aceite como verdadeiro levando a concluir que existe linearidade em toda a gama de trabalho e, segundo o teste das áreas normalizadas, a reta de calibração pode ser usada para quantificar humulinonas. (Figura 16).

## 2.2.2. ICS I4

- **Teste de Mandel**

Tabela 15: Valores das variâncias da curva de calibração de grau 1 e da curva de calibração de grau 2 para o padrão ICS-I4

<b>S<sub>Y/x</sub> (1)</b>	13,87
<b>S<sub>Y/x</sub> (2)</b>	14,56

Tabela 16: Resultados do teste de Mandel para o padrão ICS-I4: o valor da diferença de variância, o valor teste e o valor tabelado da distribuição de Fisher (Anexo 2)

<b>DS<sup>2</sup></b>	11,11
<b>VT</b>	0,76
<b>F<sub>crit.</sub></b>	18,51

Observando os resultados obtidos na Tabela 16, concluímos que, para a reta de calibração do padrão ICS-I4, a hipótese nula ( $H_0$ ) também é aceite, isto é,  $VT \leq F_{critico}$ .  $P01$  apresenta melhor ajuste do que  $P02$  logo, a reta de calibração do padrão ICS-I4 apresenta linearidade e pode ser usada para quantificar ácidos iso- $\alpha$ .

- **Teste das Áreas Normalizadas**

Tabela 17: Valores do sinal analítico normalizados para o padrão ICS-I4

<b>Padrão</b>	<b>Sinal Teórico (UA)</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Sinal Obtido (UA)</b>	<b>Sinal Normalizado (UA)</b>
<b>P1</b>	126,1	5	124,7	91,3
<b>P2</b>	262,1	10	260,4	95,3
<b>P3</b>	398,2	15	415,1	101,3
<b>P4</b>	534,2	20	533,7	97,7
<b>P5</b>	670,3	25	663	97,1
<b>P6</b>	806,3	30	786	95,9
<b>P7</b>	1078,4	40	1092,7	100

Através dos resultados da Tabela 17 obtém-se o gráfico na Figura 17 que representa a dispersão dos sinais normalizados compreendidos entre 85% e 110%.

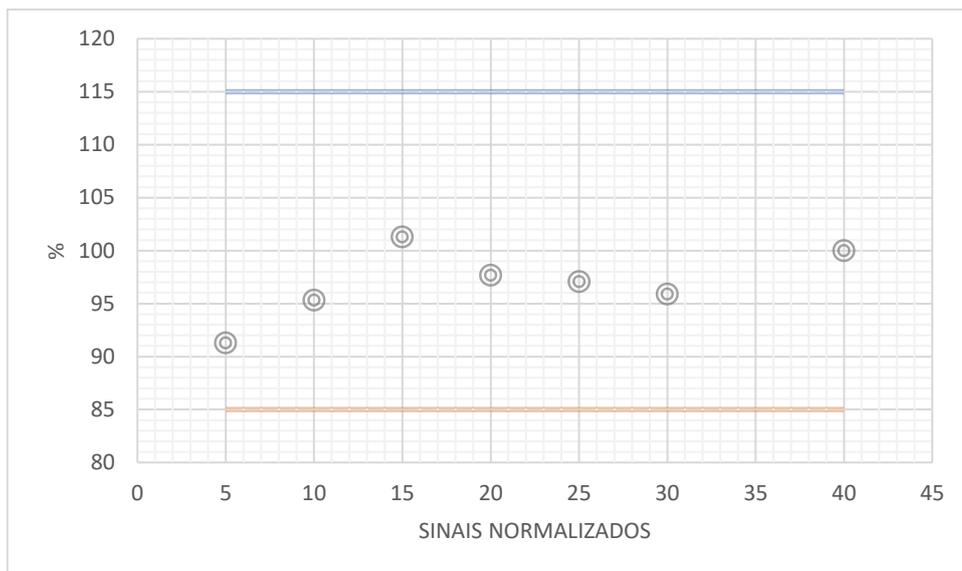


Figura 17: Representação gráfica dos sinais normalizados do padrão ICS-I4 para o teste das áreas normalizadas

Por observação da Figura 17 verificamos que os sinais normalizados da reta de calibração do padrão ICS-I4 também se encontram dispersos. Porém, também estes sinais estão compreendidos entre 85% e 115% o que leva a concluir que, segundo o teste das áreas normalizadas, existe linearidade em toda a gama de trabalho a reta de calibração pode ser usada para quantificar ácidos iso- $\alpha$ .

### 2.2.3. ICS-T3

- **Teste de Mandel**

Tabela 18: Valores das variâncias da curva de calibração de grau 1 e da curva de calibração de grau 2 para o padrão ICS-T3

<b><math>S_{Y/x (1)}</math></b>	2,65
<b><math>S_{Y/x (2)}</math></b>	2,91

Tabela 19: Resultados do teste de Mandel para o padrão ICS-T3: o valor da diferença de variância, o valor teste e o valor tabelado da distribuição de Fisher (Anexo 2)

<b><math>DS^2</math></b>	1,62
<b>VT</b>	0,56
<b><math>F_{tab}</math></b>	18,51

Observando os resultados obtidos na Tabela 19 concluímos que, para a reta de calibração do padrão ICS-T4, a hipótese nula ( $H_0$ ) também é aceite, isto é,  $VT \leq F_{crítico}$ . A reta de calibração do padrão ICS-T3 apresenta linearidade e pode ser usada para quantificar tetra-hidro-iso- $\alpha$  ácidos.

- **Teste das Áreas Normalizadas**

Tabela 20: Valores do sinal analítico normalizados para o padrão ICS-T3

Padrão	Sinal Teórico (UA)	Concentração (mg/L)	Sinal Obtido (UA)	Sinal Normalizado (UA)
P1	124,7	5	37,5	100,1
P2	248,2	10	75,4	100,6
P3	371,7	15	113,4	100,9
P4	495,3	20	152,6	101,8
P5	618,8	25	183,7	98,1
P6	742,4	30	220,2	97,9
P7	989,5	40	299,8	100

Através dos resultados da Tabela 20 obtém-se o gráfico na Figura 18 que representa os sinais normalizados compreendidos entre 85% e 110%.

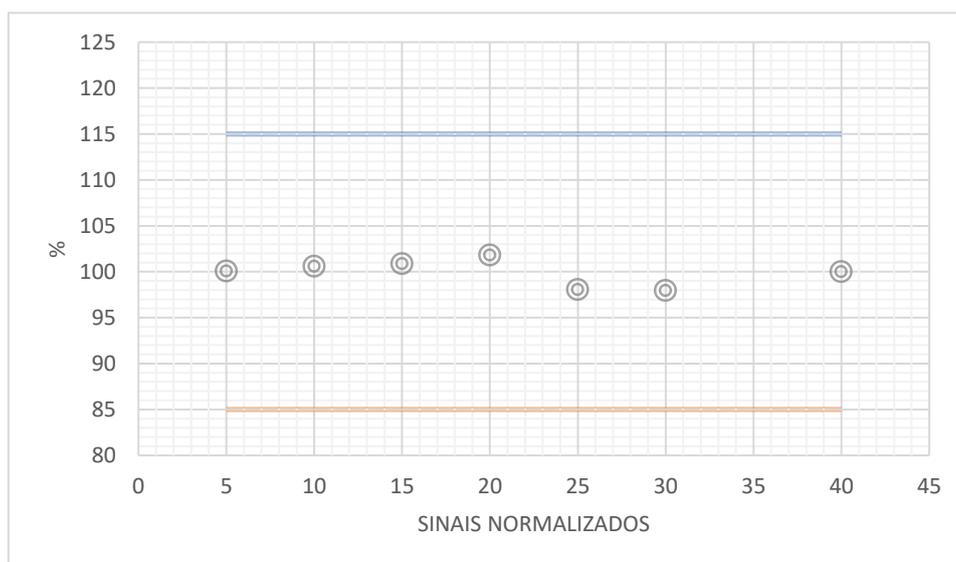


Figura 18: Representação gráfica dos sinais normalizados do padrão ICS-T3 para o teste das áreas normalizadas

Por observação da Figura 18 verifica-se que os sinais normalizados da reta de calibração do padrão ICS-T3 não se encontram com tanta dispersão como os valores dos padrões ICS-Hum 1 e ICS-I4 tendo assim um melhor ajuste. Todos os sinais estão compreendidos entre 85% e 115% o que leva a concluir que, segundo o teste das áreas normalizadas, existe linearidade em toda a gama de trabalho e a reta de calibração pode ser usada para quantificar tetra-hidro-iso- $\alpha$  ácidos.

### 2.2.4. ICE-3

- **Teste de Mandel**

Tabela 21: Valores das variâncias da curva de calibração de grau 1 e da curva de calibração de grau 2 para o padrão ICE-3

<b>S<sub>Y/x</sub> (1)</b>	1,31
<b>S<sub>Y/x</sub> (2)</b>	0,61

Tabela 22: Resultados do teste de Mandel para o padrão ICE-3: o valor da diferença de variância, o valor teste e o valor tabelado da distribuição de Fisher (Anexo 2)

<b>DS<sup>2</sup></b>	4,09
<b>VT</b>	6,73
<b>F<sub>tab</sub></b>	18,51

Observando os resultados obtidos na Tabela 22 concluímos que, para a reta de calibração do padrão ICE-3, a hipótese nula ( $H_0$ ) também é aceite, isto é,  $VT \leq F_{crítico}$ . O modelo P01 também apresenta melhor ajuste do que o modelo P02. A reta de calibração do padrão ICE-3 apresenta linearidade e pode ser usada para quantificar ácidos  $\alpha$  e ácidos  $\beta$ .

- **Teste das Áreas Normalizadas**

Tabela 23: Valores do sinal analítico normalizados para o padrão ICE-3

<b>Padrão</b>	<b>Sinal Teórico (UA)</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>	<b>Sinal Obtido (UA)</b>	<b>Sinal Normalizado (UA)</b>
<b>P1</b>	6,9	0,5	7,8	85,7
<b>P2</b>	16,7	1	17,8	97,8
<b>P3</b>	26,5	1,5	25,9	94,9
<b>P4</b>	36,4	2	34,8	95,6
<b>P5</b>	46,2	2,5	45,5	100
<b>P6</b>	56,1	3	55,3	101,3
<b>P7</b>	75,7	4	77,3	106,2

Através dos resultados da Tabela 23 obtém-se o gráfico na Figura 19 que representa graficamente os sinais normalizados compreendidos entre 85% e 110%.

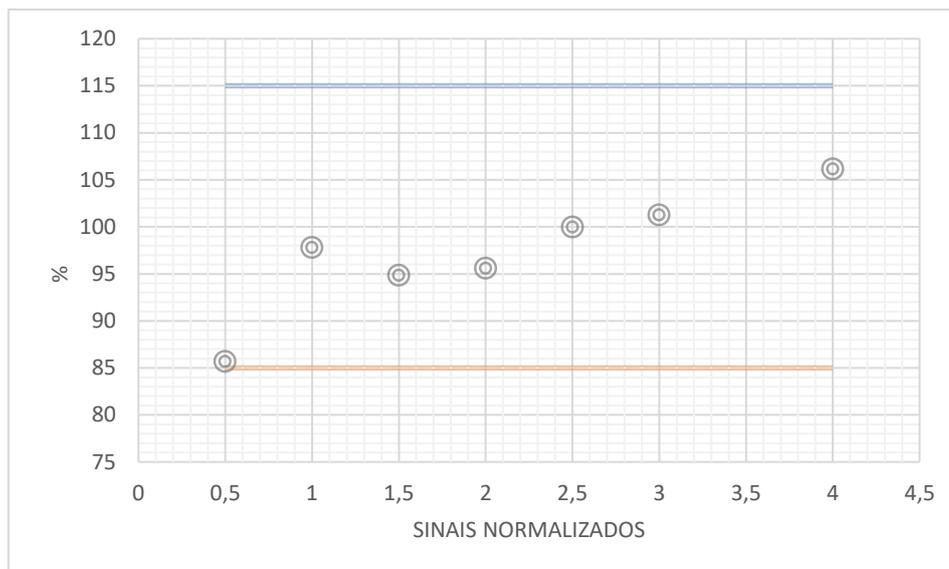


Figura 19: Representação gráfica dos sinais normalizados do padrão ICE-3 para o teste das áreas normalizadas

Por observação da Figura 19 verificamos que os sinais normalizados da reta de calibração do padrão ICE-3 estão dispersos. Contudo, todos os sinais estão compreendidos entre 85% e 115% o que leva a concluir que, segundo o teste das áreas normalizadas, existe linearidade em toda a gama de trabalho a reta de calibração pode ser usada para quantificar ácidos  $\alpha$  e ácidos  $\beta$ .

Todas as retas de calibração, ICS-Hum1, ICS-I4, ICS-T3 e ICE-3, apresentaram linearidade e podem ser usadas para quantificar os respetivos compostos. Apesar de no teste das áreas normalizadas os resultados estarem dispersos entre si, a linearidade foi comprovada devido a, em todos os casos, os valores dos sinais normalizados estarem compreendidos dentro do intervalo de confiança (entre 85% e 115 %).

### 2.3. Teste da gama analítica

A gama analítica é avaliada recorrendo ao teste de homogeneidade de variâncias. Este teste é usado quando o método recorre a uma curva de calibração. Para realizar este teste foram realizadas 10 réplicas independentes do primeiro e do último padrão com o objetivo de verificar se existe diferença entre as variâncias nos limites da gama de trabalho. As variâncias são comparadas através do valor teste de Fisher,  $F(TV)$ , e através valor crítico de Fisher,  $F$ , para um nível de confiança de 95%. (ver 3.6 Capítulo 2)

### 2.3.1. ICS Hum-1

Tabela 24: Resultado do teste da homogeneidade de variância obtido para o padrão ICS Hum-1. Foram realizadas 10 repetições independentes entre si. O valor usado para o cálculo representa a soma de todos os isômeros presentes no padrão.

Medição	P1			Soma	P7			Soma
	1	2	3		1	2	3	
1	4,4	7,8	2,3	14,5	38,1	65,4	16,3	119,8
2	4,6	7,8	2,4	14,8	39,1	65,8	15,6	120,5
3	4,6	7,4	2	14	38,8	65,4	16,2	120,4
4	4,7	7,4	2,1	14,2	39,4	65,9	15,4	120,7
5	4,5	7,3	2,2	14	39,4	65,5	15,6	120,5
6	4,6	7,6	2,2	14,4	38,6	65,8	16	120,4
7	4,7	7,7	1,8	14,2	38,4	63,9	15,9	118,2
8	4,5	7,4	1,8	13,7	39,1	66	15,1	120,2
9	4,3	7,3	1,9	13,5	39,5	65,5	15	120
10	4,2	7,1	1,8	13,1	39,4	65	15,6	120
<b>S<sub>M</sub></b>				0,25				0,51

Tabela 25: Resultado do valor teste de Fisher e do valor crítico de Fisher para o teste da homogeneidade de variância do padrão ICS Hum-1

<b>VT</b>	2,02
<b>F<sub>crit</sub></b>	3,18

Para o teste da homogeneidade de variância também são assumidas duas hipóteses, a hipótese nula ( $H_0$ ) que assume que  $VT \leq F_{crítico}$ , e a hipótese alternativa ( $H_1$ ) que assume que  $VT > F_{crítico}$ . Através da comparação entre o valor teste de  $F$  ( $TV$ ) e o valor crítico de  $F$  apresentados na Tabela 25 verifica-se que o primeiro é inferior ao segundo, traduzindo-se assim na aceitação da hipótese nula ( $H_0$ ). Tal significa que não existe diferença estatisticamente significativa entre as variâncias e, conseqüentemente, há homogeneidade de variâncias. Assim, a gama de trabalho instrumental utilizada, em termos de equipamento, é aceite e pode ser usada.

### 2.3.2. ICS-I4

Tabela 26: Resultado do teste da homogeneidade de variância obtido para o padrão ICS-I4. Foram realizadas 10 repetições independentes entre si. O valor usado para o cálculo representa a soma de todos os isômeros presentes no padrão.

Medição	P1			Soma	P7			Soma
	1	2	3		1	2	3	
1	50,5	80,3	18,3	149,1	371,5	591,6	128,9	1092
2	51,1	80,1	18	149,2	372,1	591,8	129,2	1093,1
n	50,7	80	18,2	148,9	371,6	591,4	129	1092
4	50,1	79,7	18,1	147,9	370,9	592,9	128,2	1092
5	51,1	79,7	18	148,8	371,1	591,1	129,6	1091,8
6	50	80,1	18,2	148,3	370,1	593,1	128,9	1092,1
7	50,7	79,8	17,9	148,4	371,2	590,6	130	1091,8
8	49,1	79,8	18,7	147,6	370,9	591	129,3	1091,2
9	48,6	78,6	18,2	145,4	371,2	592,2	129,3	1092,7
10	48,7	78,7	18	145,4	372,1	590	128,5	1090,6
<b>S<sub>M</sub></b>				1,99				0,48

Tabela 27: Resultado do valor teste de Fisher e do valor crítico de Fisher para o teste da homogeneidade de variância do padrão ICS-I4

<b>TV</b>	0,24
<b>F<sub>crit.</sub></b>	3,18

Através da comparação entre o valor teste de  $F$  ( $TV$ ) e o valor crítico de  $F$  apresentados na Tabela 27 verifica-se que o primeiro é inferior ao segundo, traduzindo-se assim na aceitação da hipótese nula ( $H_0$ ). Tal significa que não existe diferença estatisticamente significativa entre as variâncias e, portanto, há homogeneidade de variâncias. Assim, para a reta de calibração do padrão ICS-I4 a gama de trabalho instrumental utilizada também é aceite.

### 2.3.3. ICS-T3

Tabela 28: Resultado do teste da homogeneidade de variância obtido para o padrão ICS-T3. Foram realizadas 10 repetições independentes. O valor usado para o cálculo representa a soma de todos os isômeros presentes no padrão

Medição	P1				Soma	P7				Soma
	1	2	3	4		1	2	3	4	
1	4,7	10,4	20,7	2	37,8	29,2	80,4	170,1	16,5	296,2
2	4,8	10,9	21	2,5	39,2	29,9	82,1	171,2	16,6	299,8
3	4,6	10,3	20,8	1,9	37,6	30	80,7	168,6	19,9	299,2
4	3,7	9,8	21	2	36,5	29,9	79,2	172,1	19,1	300,3
5	4,7	11,1	20,5	2,3	38,6	29	79,1	172,3	19,2	299,6
6	4,3	10,5	20,8	2,5	38,1	29,3	78,4	173,4	19,2	300,3
7	4,1	10,7	21,6	2,8	39,2	29,1	81,3	169,2	19,5	299,1
8	3,7	9,7	20,2	1,8	35,4	30,1	79,6	170,1	19,4	299,2
9	3,8	9,4	19,5	2,3	35	29,9	79,8	171,2	19,2	300,1
10	3,9	9,4	20,5	1,7	35,5	30,3	80,2	169,3	19,1	298,9
<b>S<sub>M</sub></b>					2,52					1,42

Tabela 29: Resultado do valor teste de Fisher e do valor crítico de Fisher para o teste da homogeneidade de variância do padrão ICS-T3

<b>TV</b>	0,56
<b>F<sub>crit</sub></b>	3,18

Através da comparação entre o valor teste de  $F$  ( $TV$ ) e o valor crítico de  $F$  apresentados na Tabela 29 verifica-se que o primeiro é inferior ao segundo, traduzindo-se assim também na aceitação da hipótese nula ( $H_0$ ). A gama de trabalho para a reta de calibração do padrão ICS-T3 apresenta homogeneidade de variância e pode ser utilizada.

### 2.3.4. ICE-3

Tabela 30: Resultado do teste da homogeneidade de variância obtido para o padrão ICE-3. Foram realizadas 10 repetições independentes. O valor usado para o cálculo representa a soma de todos os isômeros presentes no padrão.

Medição	P1		Soma	P7		Soma
	1	2		1	2	
1	2,7	5,2	7,9	24,3	45,1	69,4
2	2,6	5,2	7,8	23,9	44,6	68,5
3	2,9	4,4	7,3	23,7	44,7	68,4
4	2,7	4,8	7,5	23,7	45	68,7
5	2,8	4,9	7,7	24,6	44,3	68,9
6	2,6	5,3	7,9	23,9	44,5	68,4
7	2,6	4,7	7,3	23,9	44,9	68,8
8	2,8	5,1	7,9	23,4	45,1	68,5
9	2,7	4,7	7,4	23,6	44,5	68,1
10	2,8	4,8	7,6	23,5	44,7	68,2
<b>S<sub>M</sub></b>			0,06			0,14

Tabela 31: Resultado do valor teste de Fisher e do valor crítico de Fisher para o teste da homogeneidade de variância do padrão ICE-3

<b>TV</b>	2,38
<b>F<sub>crit</sub></b>	3,18

$F(TV) < F_{critico}$  (Tabela 31) traduzindo-se assim na aceitação da hipótese nula ( $H_0$ ). A gama de trabalho para a reta de calibração do padrão ICE-3 também apresenta homogeneidade de variância e pode ser utilizada.

Através do teste de homogeneidade de variância verificamos que as quatro retas de calibração apresentam homogeneidade entre os resultados e que, em termos de equipamento, as gamas de trabalho para todos os analitos de interesse podem ser usadas.

## 2.4 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de quantificação ( $LQ$ ) representa a menor concentração medida na qual é possível quantificar o analito com exatidão e precisão. O limite de detecção ( $LD$ ) representa a menor concentração medida na qual é possível detetar o analito com exatidão e precisão. O limite de detecção depende do sistema cromatográfico e das condições do momento da análise de

amostra e, por isso, é de extrema importância verificar este limite quando há uma alteração das condições cromatográficas como, mudança de coluna, mudança de detetor ou sistema de injeção. A Tabela 32 apresenta as retas de calibração de cada padrão com o respetivo valor de  $S_{y/x}$  e declive ( $m$ ) necessário para a obtenção dos limiares analíticos. (ver 3.7 Capítulo 2)

Tabela 32: Retas de calibração de cada padrão com o respetivo valor de  $S_{y/x}$  e declive ( $m$ ) necessário para a obtenção dos limiares analíticos

Composto	Declive ( $m$ )	$S_{y/x}$	Equação da reta de calibração
ICS Hum-1	2,71	2,71	$y= 2,7125x-2,3295$
ICS-I4	27,21	13,87	$y=27,209x-9,9588$
ICS-T3	24,71	2,65	$y=24,709x+1,1066$
ICE-3	19,66	1,31	$y=19,659x-2,9508$

Os limites de quantificação e deteção para cada padrão, com a respetiva gama de trabalho, estão apresentados na Tabela 33.

Tabela 33: Limites de quantificação e de deteção obtidos para todos os padrões com as respetivas gamas de trabalho

Padrão	Gama de Trabalho (mg/L)	LQ (mg/L)	LD (mg/L)
ICS Hum-1	5 - 40	10,11	3,30
ICS-I4	5 - 40	5,15	1,68
ICS-T3	5 - 40	1,08	0,35
ICE-3	0.5 - 4	0,67	0,23

Observando os limites de quantificação e deteção de todos os padrões usados para traçar as retas de calibração (Tabela 33) verificamos que o método necessita de alguns ajustes. Os valores dos padrões de menor concentração ( $P1$ ) dos padrões ICS-I4 e ICE-3 tem de ser ajustados com o valor dos limites de quantificação obtidos individualmente. Apenas o padrão ICS-T3 obteve resultados satisfatórios e não necessita de alterações. Observando o valor do limite de quantificação do padrão Hum-1 conclui-se que este método não é fiável para quantificar humulinonas isto porque, as amostras podem apresentas concentrações de humulinonas inferiores a 10,11 mg/L.

Os limites de deteção encontram-se todos inferiores ao valor da concentração do primeiro padrão (*P1*) o que indica que, apesar de não ser possível quantificar pequenas concentrações de analito, estas são detetadas pelo método.

Os limiares analíticos tendem a variar ao longo do tempo e podem ser melhorados. O resultado insatisfatório do padrão ICS Hum-1 pode dever-se ao facto de este se encontrar fora do prazo de validade. Os padrões usados para este projeto já se encontravam disponíveis na *Super Bock Group* antes do início do projeto e não estão disponíveis as datas de compra e de validação.

## 2.5 Repetibilidade

A repetibilidade de um método interlaboratorial efetua-se com um mínimo de 10 repetições sobre a mesma amostra. Para um nível de confiança de 95%,  $\Delta r$  corresponde à diferença absoluta entre dois resultados obtidos a partir de dois ensaios independentes. O limite de repetibilidade representa o valor máximo aceite para representar a diferença absoluta entre dois ensaios em condições de repetibilidade e para um nível de confiança de 95%. Para o estudo da repetibilidade também foi considerado o *CV(%)* uma vez que este representa o quociente entre o desvio-padrão de repetibilidade e a média dos resultados. (ver 3.8.1 Capítulo 2)

Para o estudo da repetibilidade foram usadas amostras de cervejas Super Bock independentes pertencentes ao mesmo Lote (L2206901) produzidas com a técnica de lupulagem tradicional.

Tabela 34: Valores obtidos durante a análise da repetibilidade usando uma amostra de uma cerveja Super Bock do Lote L2206901.

Amostra	Lote	Amargor Total	$ X_i - X_{i-1} $	$ X_i - X_{i-1}  \leq r$
1	L2206901	18,03	2,93	há repetibilidade
2		15,10	1,17	há repetibilidade
3		16,26	1,78	há repetibilidade
4		14,49	4,03	há repetibilidade
5		18,52	2,85	há repetibilidade
6		15,67	0,16	há repetibilidade
7		15,83	2,73	há repetibilidade
8		18,56	0,34	há repetibilidade
9		18,22	4,39	há repetibilidade
10		13,83	2,62	há repetibilidade

Tabela 35: Média, Desvio-Padrão, Limite de Repetibilidade e CV para o estudo da repetibilidade usando amostras de Super Bock independentes do Lote L2206901

Média	16,45
Desvio-Padrão	1,76
Limite de Repetibilidade	4,93
Cv (%)	10,71

Foi testada a presença de *outliers* através do teste de Grubbs e o estudo não apresentou valores discrepantes. Através dos resultados da tabela 35 conclui-se que, tendo em conta a diferença absoluta entre dois resultados, existe repetibilidade. A diferença absoluta entre dois resultados não é superior ao limite de repetibilidade. O valor de CV (%) é ligeiramente superior ao valor aceite (10 %) indicando que existe uma dispersão nos resultados ligeiramente superior à aceite. Esta dispersão dos resultados pode estar relacionada com erros sistemáticos de ensaio ou erros grosseiros durante a preparação das amostras. Como estamos perante amostras independentes, estas não foram analisadas no mesmo dia e não tiveram uma idêntica preparação de amostra. Estes fatores poderiam ter afetados o ensaio de repetibilidade e levado a um valor de CV mais elevado do que o esperado.

## **Capítulo V**

Conclusão

A implementação e validação de um método de análise de ácidos  $\alpha$ , ácidos  $\beta$  e humulinonas por HPLC baseia-se numa readaptação de um método inicial “*Dosage des acides alfa, des acides iso-alpha et des acides tetra-hydro-iso alfa par HPLC*” implementado pela cervejaria *Kronenbourg*.<sup>[20]</sup> Este método foi escolhido pela empresa devido ao facto de possuir semelhanças com o método da *Convenção Europeia do Fabrico de Cervejas* (EBC).<sup>[16]</sup>

O objetivo inicial do projeto centrava-se em verificar se o método utilizado pela empresa para a quantificação de ácidos  $\alpha$  e ácidos  $\beta$ , também permitia quantificar humulinonas e xantohumol. Este apresentou uma lomba na linha de base que não permitia a correta quantificação dos analitos de interesse. Tendo em conta que o equipamento também é usado para a análise de ácido sórbico e este método não apresentou nenhuma alteração, os fatores que poderiam estar a afetar a análise seriam a coluna cromatográfica ou a bomba de mistura da fase móvel. A coluna cromatográfica foi substituída e a bomba de mistura testada. Não apresentaram anomalias e concluiu-se que o problema apenas poderia vir do método usado. O problema foi solucionado alterando-se o gradiente do método e foi constatado que, apesar de serem necessárias ligeiras alterações, o método continuava a identificar e a quantificar ácidos  $\alpha$  e ácidos  $\beta$ . Foi testada a quantificação de humulinonas com o mesmo método e verificou-se que também identificava humulinonas.

Foram obtidas as curvas de calibração através de padrões que contêm os analitos de interesse e verificou-se que cada uma possuía linearidade. A gama de trabalho escolhida encontrava-se pré-definida no método usado inicialmente pela *Super Bock Group*. A linearidade de cada curva de calibração foi testada recorrendo ao teste de Mandel e ao teste das áreas normalizadas. Segundo ambos os testes, as retas de calibração apresentam linearidade. A nível de equipamento, segundo o teste da homogeneidade de variância, a gama de trabalho apresenta homogeneidade e pode ser usada. Para o padrão ICS Hum-1 a sensibilidade obtida foi de 2,71, para o padrão ICS-I4 foi de 27,21, para o padrão ICS-T3 foi de 24,71 e por fim, para o padrão ICE-3 foi de 19,66.

Os limites de quantificação (*LQ*) comprovaram que o método não reúne as condições exatas para a determinação destes compostos isto porque, para os padrões ICS Hum-1 (*LQ*: 10,11 mg/L; *P1*: 5 mg/L), ICS-I4 (*LQ*: 5,15 mg/L; *P1*: 5 mg/L), e ICE-3 (*LQ*: 0,67 mg/L; *P1*: 0,5 mg/L), os limites de quantificação encontram-se ligeiramente superiores ao valor do primeiro padrão (*P1*). Seria necessário reajustar a gama de trabalho. Os limites de deteção (*LD*) encontram-se todos inferiores ao valor de concentração do primeiro padrão (*P1*) levando a considerar que, apesar de não ser possível quantificar ICS Hum-1, ICS-I4 e ICE-3 abaixo dos seus limites de quantificação, é possível detetar os mesmos neste intervalo.

A repetibilidade foi testada usando amostras de cervejas *Super Bock* e, a diferença absoluta entre dois resultados de ensaios, apresentou repetibilidade, mas com o valor de coeficiente de variação ligeiramente superior a 10% (10,71). Este fator pode ser devido a erros grosseiros como, diferentes preparações ou diferentes temperaturas de amostra. O limite de repetibilidade obtido foi de 4,93 mg/L.

Para verificar estas condições de análise insatisfatórias seria ideal testar o método em outro equipamento que confirmasse o seu bom funcionamento. Apesar de não ter sido identificado nenhum problema técnico por parte da assistência técnica da *Agilent* e de o equipamento ter sofrido todas as manutenções, continua em aberto a questão de porque um método que outrora funcionava e que foi validado ter deixado de dar resultados. Tendo em conta que a linha de base sofre alterações com o gradiente do método, o foco do problema continua a ser na bomba de mistura da fase móvel.

Com o aparecimento da pandemia da Covid-19 o trabalho foi interrompido e não foi possível ajustar o método e concluir a sua validação e os únicos valores existentes para comparação são de cervejas feitas por *dry-hopping*. Seria necessário, após a verificação do método, confirmar que os valores obtidos pelo presente método são idênticos aos valores obtidos por um laboratório externo certificado.

A nível pessoal, o estágio teve um grande impacto positivo porque revelou a possibilidade de obter conhecimentos aprofundados sobre a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a possibilidade de integração no Laboratório Central do Grupo Super Bock. A visão do mundo profissional foi alterada uma vez que foi adquirida a noção do rigor e da organização existente num laboratório de controlo de qualidade de uma grande empresa.

## **Capítulo VI**

Referências bibliográficas

- [1] Super Bock Group: <https://www.superbockgroup.com/detalhe/sobre-o-grupo/>
- [2] Super Bock Group: <https://www.superbockgroup.com/historia/>
- [3] HORNSEY I. *A history of beer and brewing*, vol. 1. Royal Society of Chemistry, Cambridge (2004)
- [4] AGUIAR Rosa N. *A Química da cerveja*. Quim. Nova esc. São Paulo. (2015)
- [5] KUNZE, W., Weber, R. *Technology Brewing and Malting*. VLB, Berlin. (2004)
- [6] SIQUEIRA P. B. et. Al. *O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis*. V. 19. Alim. Nutr. Araraquara (2008)
- [7] REBELLO Flavia F. P. *Produção de cerveja*. Revista agrogeoambiental. (2009)
- [8] OLIVEIRA Nayara A. M. *Leveduras utilizadas no processo de fabricação de cerveja*. UFMG (2011)
- [9] FRANCIELI Mega; NEVES Etney; ANDRADE Cristiano J. *A produção de cerveja no brasil*. Revista citino. Vol.1 No.1 (2011)
- [10] RAINHA e SILVA H. *Estudo do efeito de novas técnicas de lupulização no tempo de prateleira da cerveja artesanal. Dissertação de Mestrado Integrado em Engenharia Biológica Ramo de Tecnologia Química e Alimentar*. Universidade do Minho. (2015)
- [11] SILVA Lucas; DURELLO Renato S. *Química do Lúpulo*. Quím. Nova vol.42 n.8. São Paulo. (2019)
- [12] Hominilúpulo: <https://www.hominilupulo.com.br/universo-da-cerveja/tecnicas-de-lupulagem/>
- [13] Cerveja e malte: <http://cervejaemalte.com.br/blog/tecnicas-de-lupulagem/>
- [14] Beercraft: <https://www.beercraft.com/introduction-hopping-methods/>
- [15] M. Verzele e D. De Keukeleire. *Development in food science 27. Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids*. Tokyo (1991)
- [16] *Convenção Europeia do Fabrico de Cervejas (EBC)*: <https://brewup.eu/ebcanalytica>
- [17] SILVA Patrícia D. *Determinação de compostos fenólicos por HPLC: Tese de Mestrado em Química Industrial*. Universidade da Beira Interior. (2012)
- [18] MENANA Marta F. F. F. *Implementação e validação do método de quantificação de Ácido Propiónico por HPLC em produtos de padaria e pastelaria: Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Tecnologia e Segurança Alimentar*. Universidade Nova de Lisboa. (2017)

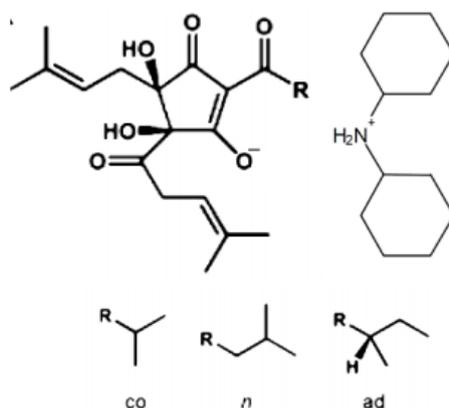
- [19] COLLINS C. H. *Químicos redescobrem a Cromatografia Líquido-Sólido*. Universidade Estadual de Campinas (2009)
- [20] BRITO Natilene M; AMARANTE JUNIOR Ozelito P; POLESE Luciana; RIBEIRO Maria L; *Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão*. Curitiba v.13. (2003)
- [21] MARTINS Andreia F.S. *Implementação e Validação de Métodos Analíticos: Tese de Mestrado*. Universidade de Coimbra. (2016)
- [22] CALCADA Susana R.R. *Validação de Métodos Físico-químicos: Tese de mestrado em Tecnologia e Ciência Alimentar*. Departamento Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto (2017)
- [23] Brasserie Kronenbourg. *Dosage des acides alpha, des acides iso-alpha et des acidees tetra-hydro-isso alfa para HPLC*. (2010)
- [24] DE KEUKELEIRC, D. *Fundamentals of beer and hop chemistry*. Quimica Nova, v. 23, n. 1, p. 108–112, (2000)

# ANEXOS

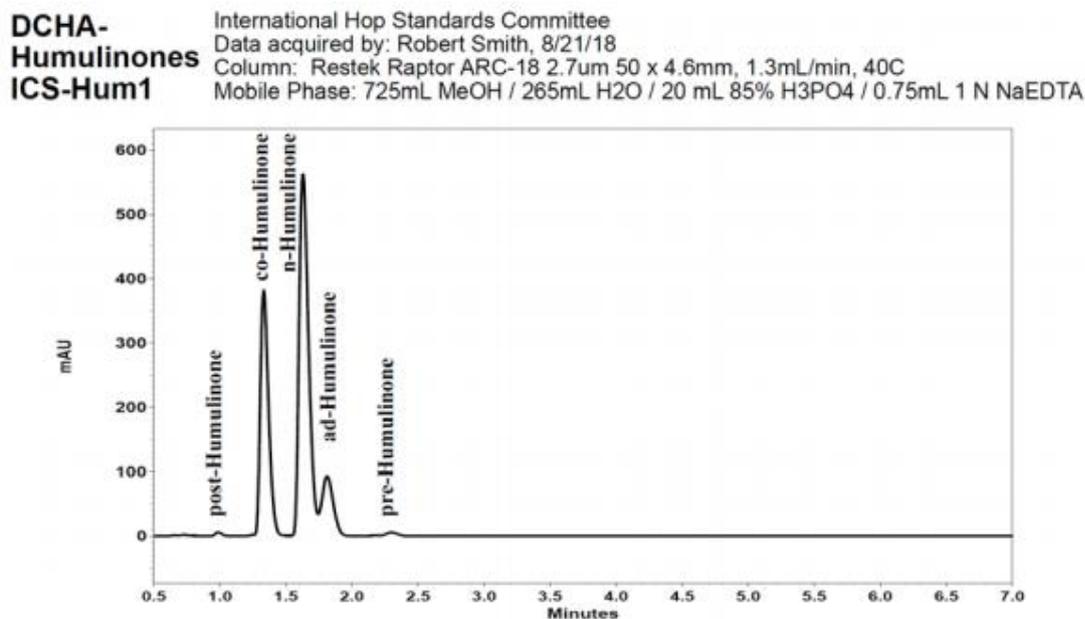
## Anexo 1 – Fichas informativas sobre os padrões utilizados

### ICS Hum-1

O padrão ICS Hum-1 representa uma preparação purificada de sais de dicitclohexilamina e sais de trans-humulina com uma concentração de humulinas de 65,6% (w/w). Esta concentração foi determinada pelo IHSC (*International Hopp Standards Committee*) e tem em consideração os três principais isômeros de humulinas: transcohumulina, transhumulina e transadhumulina. O lúpulo e as cervejas produzidas por *dry hopping* apenas contêm humulinas na forma *trans*. A representação gráfica dos três principais isômeros *trans* da humulina presentes no ICS Hum-1 estão abaixo indicados.

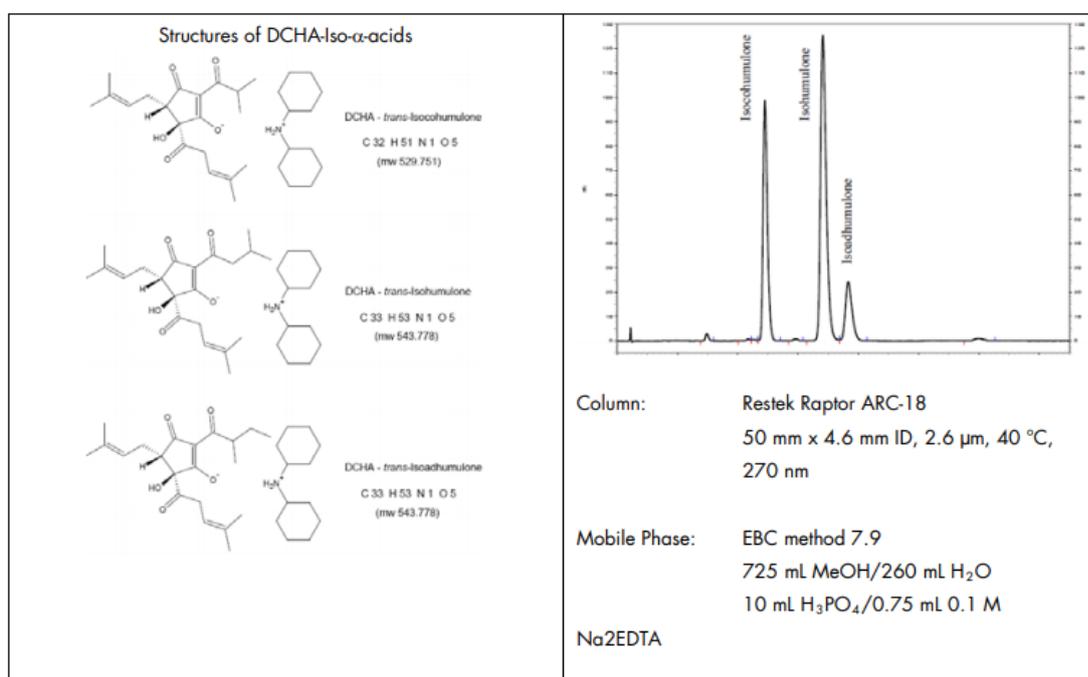


Um exemplo de cromatograma para o padrão ICS Hum-1 é:



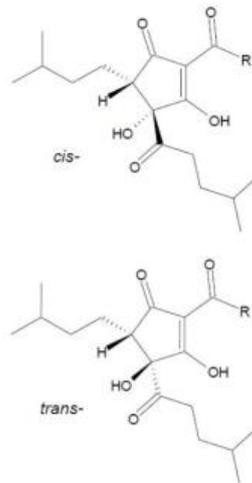
## ICS-I4

O ICS-I4 representa um composto seemicristalino purificado de trans-iso- $\alpha$  na forma de sal de diciclohexilamina (DCHA) e com uma concentração de 65,2 % (w/w). Esta concentração foi determinada pelo sistema internacional de padrões de ácidos  $\alpha$  de lúpulo isomerizado em tem na sua constituição os três principais isômeros dos ácidos  $\alpha$ : trans-isocohumulona, transisohumulona e transisoadhumulona. A representação gráfica dos três principais isômeros do composto ICS-I4 com o respectivo exemplo de cromatograma estão abaixo indicados.



## ICS-T3

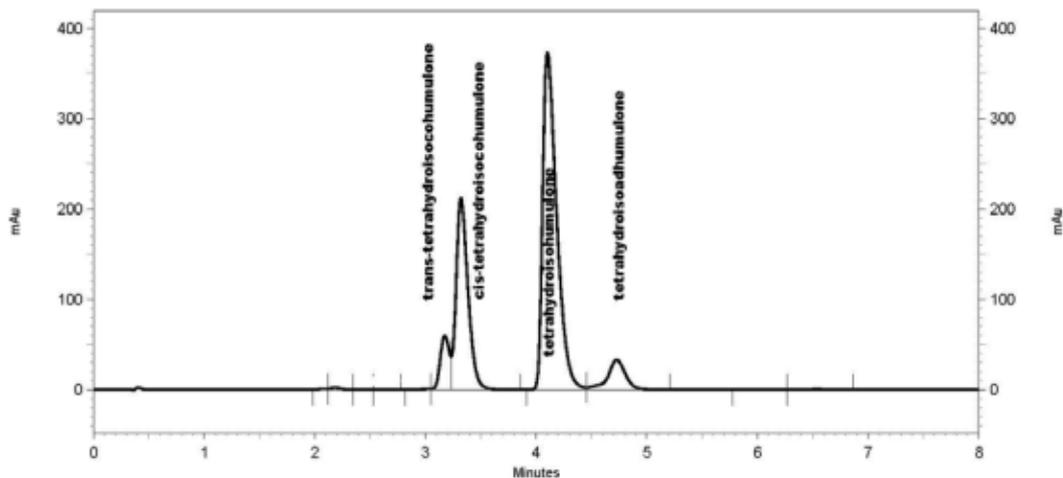
O ICS-T3 é um composto purificado de tetrahydroiso- $\alpha$ -ácidos que contêm os isômeros *cis* e *trans* com uma concentração de 99,4 % (w/w). Esta concentração foi determinada pelo IHSC (*International Hopp Standards Commitee*) e tem em consideração apenas os isômeros *cis* e *trans* da tetrahydroisocohumulona, tetrahydroisohumulona e tetrahydroisoadhumulona. A representação gráfica dos isômeros *cis* e *trans* dos tetrahydroiso- $\alpha$ -ácidos estão abaixo indicados.



Um exemplo de cromatograma para o padrão ICS-T3 é o seguinte:

### Tetra ICS-T3

International Subcommittee for Isomerized Hop Alpha Acids Standards  
Data acquired by: Bob Smith 2/16/12  
Column: Phenomenex C18 at 270nm 50mm x 4.6mm x 2.6um at 40C  
Mobile Phase: 730mL MeOH/ 280mL H2O/ 10mL H3PO4/ 1mL Na2EDTA



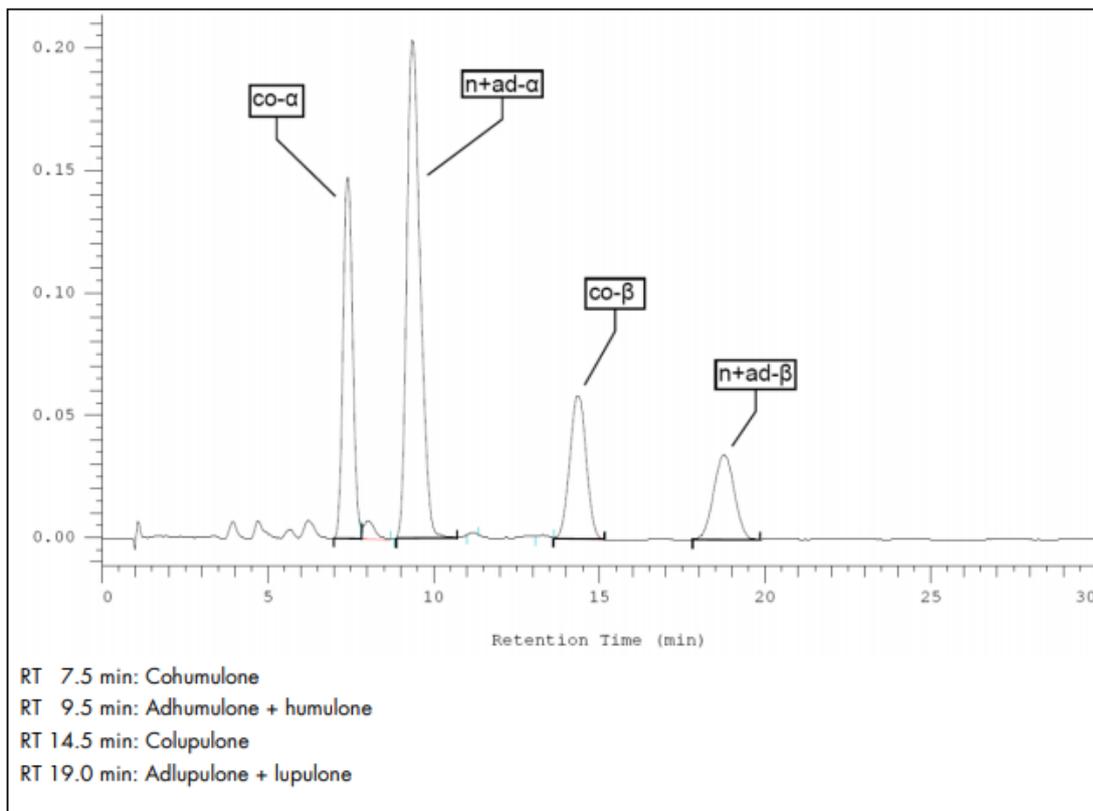
## ICE-3

O composto ICE-3 representa um extrato de lúpulo que contém uma concentração específica de ácidos  $\alpha$  e ácidos  $\beta$ .

A seguinte composição de Ice-3 foi determinada em conformidade e acordada pelo *International Hop Standards Committee (IHSC)*:

Cohumulone	13.88 %	Colupulone	13.44 %
N+adhumulone	30.76 %	N+adlupulone	10.84 %
Total $\alpha$ -acids	44.64 %	Total $\beta$ -acids	24.28 %

Um exemplo de cromatograma para o padrão ICE-3 é o seguinte:



## Anexo 2 – Tabelas de testes estatísticos

Valores críticos da distribuição de Fisher unilateral ( $\alpha= 0,05$ ):

$\nu_1 \backslash \nu_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	236.8	238.9	240.5	241.9	243.9	245.9	248.0
2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.30	19.33	19.35	19.37	19.38	19.40	19.41	19.43	19.45
3	10.13	9.552	9.277	9.117	9.013	8.941	8.887	8.845	8.812	8.786	8.745	8.703	8.660
4	7.709	6.944	6.591	6.388	6.256	6.163	6.094	6.041	5.999	5.964	5.912	5.858	5.803
5	6.608	5.786	5.409	5.192	5.050	4.950	4.876	4.818	4.772	4.735	4.678	4.619	4.558
6	5.987	5.143	4.757	4.534	4.387	4.284	4.207	4.147	4.099	4.060	4.000	3.938	3.874
7	5.591	4.737	4.347	4.120	3.972	3.866	3.787	3.726	3.677	3.637	3.575	3.511	3.445
8	5.318	4.459	4.066	3.838	3.687	3.581	3.500	3.438	3.388	3.347	3.284	3.218	3.150
9	5.117	4.256	3.863	3.633	3.482	3.374	3.293	3.230	3.179	3.137	3.073	3.006	2.936
10	4.965	4.103	3.708	3.478	3.326	3.217	3.135	3.072	3.020	2.978	2.913	2.845	2.774
11	4.844	3.982	3.587	3.357	3.204	3.095	3.012	2.948	2.896	2.854	2.788	2.719	2.646
12	4.747	3.885	3.490	3.259	3.106	2.996	2.913	2.849	2.796	2.753	2.687	2.617	2.544
13	4.667	3.806	3.411	3.179	3.025	2.915	2.832	2.767	2.714	2.671	2.604	2.533	2.459
14	4.600	3.739	3.344	3.112	2.958	2.848	2.764	2.699	2.646	2.602	2.534	2.463	2.388
15	4.543	3.682	3.287	3.056	2.901	2.790	2.707	2.641	2.588	2.544	2.475	2.403	2.328
16	4.494	3.634	3.239	3.007	2.852	2.741	2.657	2.591	2.538	2.494	2.425	2.352	2.276
17	4.451	3.592	3.197	2.965	2.810	2.699	2.614	2.548	2.494	2.450	2.381	2.308	2.230
18	4.414	3.555	3.160	2.928	2.773	2.661	2.577	2.510	2.456	2.412	2.342	2.269	2.191
19	4.381	3.522	3.127	2.895	2.740	2.628	2.544	2.477	2.423	2.378	2.308	2.234	2.155
20	4.351	3.493	3.098	2.866	2.711	2.599	2.514	2.447	2.393	2.348	2.278	2.203	2.124
22	4.301	3.443	3.049	2.817	2.661	2.549	2.464	2.397	2.342	2.297	2.226	2.151	2.071
25	4.242	3.385	2.991	2.759	2.603	2.490	2.405	2.337	2.282	2.236	2.165	2.089	2.007
30	4.171	3.316	2.922	2.690	2.534	2.421	2.334	2.266	2.211	2.165	2.092	2.015	1.932

Valores críticos da distribuição de Fisher unilateral ( $\alpha= 0,01$ ):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20
2	98.50	99.00	99.17	99.25	99.30	99.33	99.36	99.37	99.39	99.40	99.42	99.43	99.45
3	34.12	30.82	29.46	28.71	28.24	27.91	27.67	27.49	27.35	27.23	27.05	26.87	26.69
4	21.20	18.00	16.69	15.98	15.52	15.21	14.98	14.80	14.66	14.55	14.37	14.20	14.02
5	16.26	13.27	12.06	11.39	10.97	10.67	10.46	10.29	10.16	10.05	9.89	9.72	9.55
6	13.75	10.92	9.78	9.15	8.75	8.47	8.26	8.10	7.98	7.87	7.72	7.56	7.40
7	12.25	9.55	8.45	7.85	7.46	7.19	6.99	6.84	6.72	6.62	6.47	6.31	6.16
8	11.26	8.65	7.59	7.01	6.63	6.37	6.18	6.03	5.91	5.81	5.67	5.52	5.36
9	10.56	8.02	6.99	6.42	6.06	5.80	5.61	5.47	5.35	5.26	5.11	4.96	4.81
10	10.04	7.56	6.55	5.99	5.64	5.39	5.20	5.06	4.94	4.85	4.71	4.56	4.41
11	9.65	7.21	6.22	5.67	5.32	5.07	4.89	4.74	4.63	4.54	4.40	4.25	4.10
12	9.33	6.93	5.95	5.41	5.06	4.82	4.64	4.50	4.39	4.30	4.16	4.01	3.86
13	9.07	6.70	5.74	5.21	4.86	4.62	4.44	4.30	4.19	4.10	3.96	3.82	3.66
14	8.86	6.51	5.56	5.04	4.69	4.46	4.28	4.14	4.03	3.94	3.80	3.66	3.51
15	8.68	6.36	5.42	4.89	4.56	4.32	4.14	4.00	3.89	3.80	3.67	3.52	3.37
16	8.53	6.23	5.29	4.77	4.44	4.20	4.03	3.89	3.78	3.69	3.55	3.41	3.26
17	8.40	6.11	5.18	4.67	4.34	4.10	3.93	3.79	3.68	3.59	3.46	3.31	3.16
18	8.29	6.01	5.09	4.58	4.25	4.01	3.84	3.71	3.60	3.51	3.37	3.23	3.08
19	8.18	5.93	5.01	4.50	4.17	3.94	3.77	3.63	3.52	3.43	3.30	3.15	3.00
20	8.10	5.85	4.94	4.43	4.10	3.87	3.70	3.56	3.46	3.37	3.23	3.09	2.94
22	7.95	5.72	4.82	4.31	3.99	3.76	3.59	3.45	3.35	3.26	3.12	2.98	2.83
25	7.77	5.57	4.68	4.18	3.85	3.63	3.46	3.32	3.22	3.13	2.99	2.85	2.70
30	7.56	5.39	4.51	4.02	3.70	3.47	3.30	3.17	3.07	2.98	2.84	2.70	2.55

Valores críticos da distribuição t -student bilateral:

$\alpha$					$\alpha$					$\alpha$				
$\nu$	0.10	0.05	0.02	0.01	$\nu$	0.10	0.05	0.02	0.01	$\nu$	0.10	0.05	0.02	0.01
2	2.92	4.30	6.96	9.92	12	1.78	2.18	2.68	3.05	24	1.71	2.06	2.49	2.80
3	2.35	3.18	4.54	5.84	13	1.77	2.16	2.65	3.01	26	1.71	2.06	2.48	2.78
4	2.13	2.78	3.75	4.60	14	1.76	2.14	2.62	2.98	30	1.70	2.04	2.46	2.75
5	2.02	2.57	3.36	4.03	15	1.75	2.13	2.60	2.95	35	1.69	2.03	2.44	2.72
6	1.94	2.45	3.14	3.71	16	1.75	2.12	2.58	2.92	40	1.68	2.02	2.42	2.70
7	1.89	2.36	3.00	3.50	17	1.74	2.11	2.57	2.90	50	1.68	2.01	2.40	2.68
8	1.86	2.31	2.90	3.36	18	1.73	2.10	2.55	2.88	60	1.67	2.00	2.39	2.66
9	1.83	2.26	2.82	3.25	19	1.73	2.09	2.54	2.86	80	1.66	1.99	2.37	2.64
10	1.81	2.23	2.76	3.17	20	1.72	2.09	2.53	2.85	100	1.66	1.98	2.36	2.63
11	1.80	2.20	2.72	3.11	22	1.72	2.07	2.51	2.82	$\infty$	1.64	1.96	2.33	2.58