

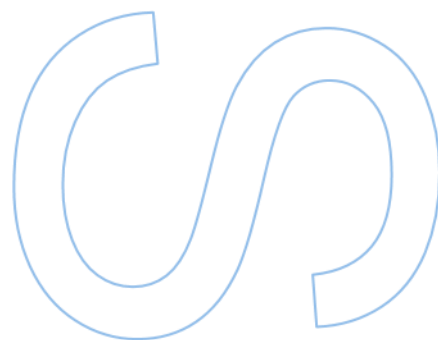
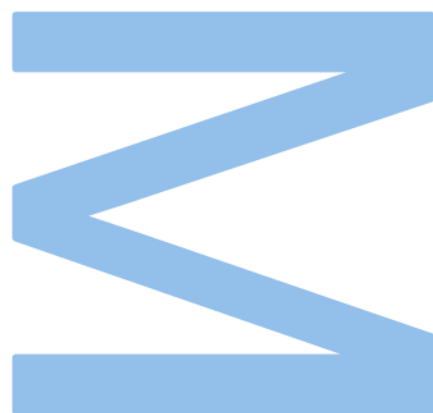
Implementação e validação de um método analítico para a determinação de compostos voláteis em cerveja por HS-SPME-GC-MS

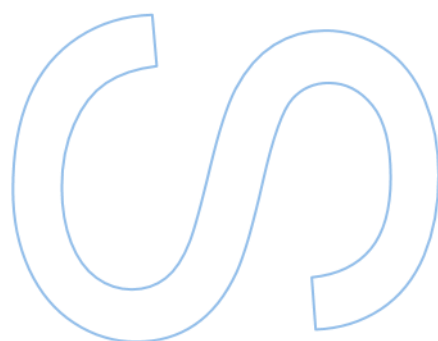
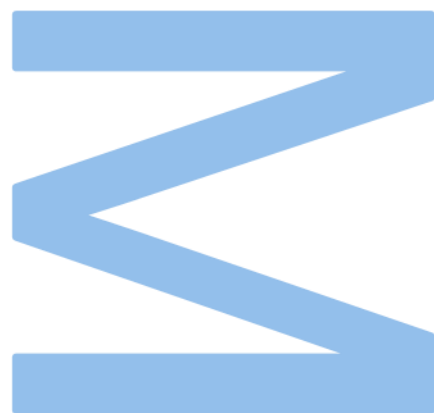
Gonçalo Cimbron Praticante

Mestrado em Métodos Avançados e Acreditação em Análise Química
Departamento de Química e Bioquímica
2022/2023

Orientador

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





Agradecimentos

Primeiramente, um agradecimento especial à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, que me acolheu durante anos na sua casa e que me transmitiu todo o conhecimento teórico e prático para enfrentar todos os desafios que me apareceram ao longo desta caminhada.

Ao Super Bock Group, por me acolher e por disponibilizar as condições ideais e a oportunidade de realizar um estágio em ambiente empresarial.

Ao professor Luís Guido, por todo o apoio prestado, pela orientação teórica fornecida e pelas sugestões científicas durante largos meses.

À Carolina Ribeiro, Técnica Superiora de Qualidade no Laboratório Central da Super Bock Group, por toda a disponibilidade em me ajudar, pelas várias formas diferentes em resolver problemas teóricos como práticos, pelo interesse demonstrado ao longo do trabalho e por toda a simpatia durante este percurso.

Um agradecimento especial também ao Fábio, ao Pedro, ao Nuno, à Matilde, ao Fausto, ao João, à Ana Sofia, ao Jorge, ao Paulo, ao Manuel, à Conceição, à Helena, à Ana Rita e ao Roque, por me terem acolhido tão bem na sua casa, pelos conhecimentos transmitidos, pela simpatia e pelo ambiente profissional ao longo do percurso do estágio.

Depois, à RUCA I, por ter sido a minha 2ª casa por mais de 5 anos. Pelos momentos passados, pelas memórias criadas, pelo companheirismo e também pelos laços criados. Levarei estas amizades comigo no coração para sempre.

E por fim, e o agradecimento mais importante, esta longa jornada não poderia ter sido realizada sem o apoio incondicional da minha família, pelo que ficarei grato para sempre por todas as palavras de encorajamento, amor e carinho durante todos os anos em que passei fora do meu lar. Sem eles, nada disto seria possível.

Resumo

Os aldeídos são compostos importantes na cerveja, seja de forma positiva ou negativa. Estes compostos conferem complexidade ao aroma e gosto característicos da cerveja, oferecendo aromas frutados, florais, doces, entre outros. Ainda assim, os aldeídos podem servir também como indicadores de envelhecimento na cerveja, quando a sua presença causa um aroma indesejado, também chamado de *off-flavour*. É por isso importante que se estude o perfil aromático de diferentes estilos de cerveja, bem como os processos de fabrico que lhes antecede.

Neste trabalho, foi implementado e validado um método de cromatografia gasosa (GC) por espectrometria de massa (MS), através da exposição de uma fibra de extração (SPME) no *headspace* (HS) de uma amostra. Os compostos voláteis utilizados no método foram o isobutiraldeído, o 2-metibutanol, o pentanal, o hexanal, a β -damascenona, o nonanal, o furfural, o (*E*)-2-octenal, o metional, o (*E*)-2-nonenal, o benzaldeído e o (*E,E*)-2,4-nonadienal. O agente derivatizante utilizado neste método foi o O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)hidroxilamina (PFBHA).

A separação cromatográfica foi efetuada numa coluna cromatográfica de fase estacionária polietileno-glicol 0,25 μ m (60m x 0.25mm) (TR-Wax), sendo o hélio o gás de arraste utilizado. A deteção dos aldeídos foi feita por modo SIM no espectrómetro de massa.

A quantificação destes compostos voláteis foi feita através do método de adição de padrão com padrão interno, onde o padrão interno escolhido foi o p-fluorobenzaldeído.

A homogeneidade de variâncias e a linearidade foram verificadas por via de testes estatísticos, com o intuito de comprovar a linearidade e o melhor ajuste dos dados ao modelo. A precisão foi também avaliada, onde a repetibilidade apresentou valores de desvio padrão relativo (RSD) situados entre os 3,0% e 27,2%. Na precisão intermédia, os RSD apresentaram valores entre os 3,2% e os 26,7%.

A realização de ensaios de recuperação ofereceu informações acerca do efeito da matriz exercido pela amostra, pelo que teve de se recorrer a métodos de adição de padrão com padrão interno, pois terão em conta a variabilidade interna da amostra.

Por fim, o método foi utilizado em diferentes tipos de cerveja, com o intuito de analisar o perfil aromático e de seguir a evolução da formação dos aldeídos ligados aos *off-flavours*.

Palavras-chave: compostos voláteis, aldeídos, *off-flavour*, GC, MS, *Headspace*, *SPME*, validação, linearidade, método de adição de padrão com padrão interno

Abstract

Aldehydes are compounds that can be important in beer, either positively or negatively. These compounds contribute to the complexity of the characteristic aroma and taste of beer, offering fruity, floral, sweet, and other aromas. However, aldehydes can also serve as indicators of beer aging when their presence causes an undesirable aroma, also known as off-flavor. It is therefore important to study the aromatic profile of different beer styles as well as the manufacturing processes that precede them.

In this work, a gas chromatography (GC) method coupled with mass spectrometry (MS) was implemented and validated by exposing a solid-phase microextraction (SPME) fiber to the headspace (HS) of a sample. The volatile compounds used in the method included isobutyraldehyde, 2-methylbutanal, pentanal, hexanal, β -damascenone, nonanal, furfural, (*E*)-2-octenal, methional, (*E*)-2-nonenal, benzaldehyde, and (*E,E*)-2,4-nonadienal. The derivatizing agent used in this method was O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine (PFBHA).

The chromatographic separation was performed on a polyethylene glycol stationary phase column with a diameter of 0.25 μm (60m x 0.25mm) (TR-Wax), with helium as the carrier gas. Aldehyde detection was carried out in selected ion monitoring (SIM) mode using mass spectrometry.

The quantification of these volatile compounds was performed using the standard addition method with an internal standard, where p-fluorobenzaldehyde was chosen as the internal standard.

Variance homogeneity and linearity were verified through statistical tests to confirm linearity and the best fit of the data to the model. Precision was also evaluated, with repeatability showing relative standard deviation (RSD) values ranging from 3,0% to 27,2%. In intermediate precision, RSD values ranged from 3,2% to 26,7%.

Conducting recovery tests provided information about the matrix effect exerted by the sample, necessitating the use of standard addition methods with an internal standard, as they take into account the internal variability of the sample.

Finally, the method was applied to different types of beer to analyze the aromatic profile and monitor the formation of aldehydes related to off-flavors.

Keywords: volatile compounds, aldehydes, off-flavor, GC (Gas Chromatography), MS (Mass Spectrometry), Headspace, SPME (Solid-Phase Microextraction), validation, linearity, internal standard and standard addition method.

Índice

Agradecimentos	ii
Resumo	iii
Abstract	v
Lista de Tabelas	x
Lista de Figuras	xii
Lista de Abreviaturas	xiv
Introdução.....	1
1. Super Bock Group.....	1
2. Cerveja.....	3
2.1. História e a sua evolução.....	3
2.2. Processo cervejeiro	6
3. Compostos Voláteis	10
3.1. Classes de compostos voláteis.....	10
3.2. Origem dos compostos	12
4. Aldeídos	14
4.1. Importância e impacto no produto.....	14
4.2. Perfil sensorial e limiares sensoriais	14
4.3. Mecanismos de formação dos aldeídos	16
4.3.1. Degradação de Strecker	16
4.3.2. Reações de Maillard.....	18
4.3.3. Oxidação Lipídica.....	19
4.4. Aldeídos livres e ligados	22
5. Instrumentação	23
5.1. GC.....	23
5.2. MS.....	31
5.3. <i>Headspace</i> -SPME	35
6. Implementação e validação de método analítico	38

6.1.	Identificação e seletividade	38
6.2.	Calibração	39
6.2.1.	Método da Adição de padrão com padrão interno	40
6.2.2.	Linearidade	43
6.2.3.	Homogeneidade de variâncias	44
6.3.	Limites analíticos	45
6.4.	Precisão.....	48
6.4.1.	Repetibilidade	48
6.4.2.	Precisão intermédia.....	49
6.4.3.	Reprodutibilidade	50
6.5.	Veracidade	51
7.	Enquadramento.....	51
	Parte experimental.....	52
1.	Materiais e métodos.....	52
1.1.	Reagentes	52
1.2.	Materiais	53
1.3.	HS-SPME-GC-MS	53
1.4.	Condições Experimentais	53
2.	Procedimento	55
2.1.	Preparação de soluções <i>stock</i>	55
2.2.	Preparação de amostras.....	58
	Resultados e discussão	60
1.	Implementação e validação do método analítico	60
1.1.	Identificação e seletividade	60
1.2.	Calibração	62
1.2.1.	Gama de concentrações	62
1.2.2.	Homogeneidade de variâncias	63
1.2.3.	Linearidade	64

1.3. Limites analíticos	68
1.4. Precisão.....	70
1.4.1. Repetibilidade	70
1.4.2. Precisão intermédia.....	72
1.5. Ensaio de Recuperação	74
1.6. Quantificação dos compostos voláteis	75
2. Discussão	79
Conclusão.....	81
Referências Bibliográficas.....	83
Anexo 1	90
Anexo 2	95
Anexo 3	98
Anexo 4	109

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Aldeídos em estudo, respetivos limiares sensoriais (concentração em µg/L, à pressão de 1 atm) e características sensoriais. Limiares sensoriais retirados de ^[1] Nick Huige et al [26], ^[2] Jeroen Baert et al [29], ^[3] Harrison et al [30], ^[4] Daan Saison et al [31]	15
Tabela 2 - Tabela-resumo dos aldeídos em estudo e dos respetivos mecanismos envolvidos na sua formação	21
Tabela 3 - Tabela-método, com respetivos tempos de retenção, janelas de análise e massas características de cada composto	55
Tabela 4 - Valores de concentração molar das soluções-mãe dos compostos em estudo.....	56
Tabela 5 - Composição e concentração molar dos aldeídos nos balões 1 e 2, ambos de 50,00 mL.....	56
Tabela 6 - Concentração molar da mistura de aldeídos num balão de 100,00 mL	57
Tabela 7 - Parâmetros utilizados para a determinação da resolução	61
Tabela 8 - Gama de concentrações estabelecidas para os balões 1, 2, 3 e 4 através da adição padrão (5, 10, 15 e 20 mL adicionados, respetivamente)	62
Tabela 9 - Sinal obtido das réplicas dos extremos do intervalo de concentrações para o isobutiraldeído	63
Tabela 10 - Dados utilizados para a curva de calibração por adição padrão da β-damascenona	65
Tabela 11 - Parâmetros utilizados para o teste de Mandel, relativamente à β-damascenona	68
Tabela 12 - Parâmetros utilizados para a determinação do LOD e LOQ (exemplo do furfural)	69
Tabela 13 - Valores de LOD e LOQ da gama de aldeídos. A amarelo, estão destacados valores abaixo de 0 de LOD e LOQ para o nonanal.....	69
Tabela 14 - Ensaio relativo à repetibilidade, através da concentração em µg/L (exceto nonanal, (E)-2-octenal e (E)-2-nonenal, a partir do sinal analítico A/A _{pi}).....	70
Tabela 15 - Parâmetros requisitados pela equação 18 (exemplo do isobutiraldeído) ..	72
Tabela 16 - Valores de RSD _{rpoole} dos aldeídos em precisão intermédia	73
Tabela 17 - Concentrações de analitos obtidas para a amostra (n.d. – não detetável; n.q. – não quantificável); Gama de concentrações retiradas de ^[1] Dayana et al [32], ^[2] Moreira et al [61], ^[3] Saison et al [31].....	76

Tabela 18 - Concentração de aldeídos em diferentes estilos de cerveja (n.d. – não detetável).....	77
--	----

Lista de Figuras

Figura 1- Diferentes produtos disponibilizados pela marca, nas mais diversas áreas de produção. Imagens retiradas do site oficial da Super Bock.	2
Figura 2 - Mosteiro de Weltenburg, situado no rio Danúbio, na Baviera. Uma das cervejeiras monásticas mais antigas do mundo. Fotografia da autoria de Val Thoermer (retirado de https://www.theguardian.com/travel/2016/dec/14/dark-beer-bavaria-oldest-monastic-brewery-in-world-weltenburg-abbey-germany).....	4
Figura 3 - Exemplos de estruturas químicas das classes de compostos voláteis presentes na cerveja. Da esquerda para a direita: Compostos carbonílicos (hexanal); Compostos com enxofre (dimetilsulfureto); Ésteres (acetato de etilo); Compostos furânicos (5-hidroximetilfurfural).....	11
Figura 4 - Reação geral da degradação de Strecker. Figura adaptada de <i>Baert et al (2012)</i>	17
Figura 5 - Variação da reação geral da degradação de Strecker. Figura adaptada de <i>Baert et al (2012)</i>	17
Figura 6 – Variação da Reação de Maillard, com furfural e 5-HMF como produto. Adaptação do artigo <i>Baert et al (2012)</i>	18
Figura 7 - Reação enzimática de oxidação lipídica. Figura adaptada de <i>Filipowska et al (2020)</i> [33].	19
Figura 8 - Reação de autooxidação lipídica. Figura adaptada de <i>Filipowska et al (2020)</i>	20
Figura 9 - Esquema geral do injetor do GC. Imagem adaptada de [36].....	26
Figura 10 - Representação do forno da coluna de um GC. Imagem adaptada de [37].	27
Figura 11 – Diferentes tipos de colunas capilares. Imagem adaptada de [39].	29
Figura 12 - Exemplo esquemático do EI. Figura adaptada de [40].	32
Figura 13 – Representação esquemática de um quadrupolo singular (A), e representação de um espectrómetro de massa <i>tandem</i> no espaço, com 3 quadrupolos inseridos (B). Imagem adaptada de [41].	33
Figura 14 - Visão esquemática de um MCP. Figura adaptada de [42].....	34
Figura 15 - Fenómenos de absorção e adsorção. Figura adaptada de [43].	36
Figura 16 - (A) - sorvente fixado na superfície de uma fibra; (B) - sorvente fixado na superfície de uma barra agitadora; (C) - sorvente fixado no interior de tubo capilar. Figura adaptada de [44].	36
Figura 17 - (A) - Etapa de pré-equilíbrio do analito entre a fase líquida e gasosa, com auxílio de temperatura; (B) - Processo de extração, onde os analitos são sorvidos na	

seringa; (C) - Dessorção térmica no injetor, seguida de volatilização e passagem para a coluna; Figura adaptada de [46].....	37
Figura 18 - Esquema geral do gráfico obtido pelo método de adição de padrão com padrão interno.....	42
Figura 19 - Cromatograma geral, com sinal (S) e ruído (N) assinalados. Figura adaptada de [58].	47
Figura 20 - Rampa de aquecimento utilizada no método.	54
Figura 21 - Configuração dos balões (50,00 mL) para o método de adição padrão. ...	58
Figura 22 - Cromatograma representativo das réplicas efetuadas para a concentração mínima e máxima do isobutiraldeído.....	64
Figura 23 - Gráfico correspondente à β -damascenona, em que o eixo das abcissas é representado por C_i/C_{pi} e das ordenadas por A/A_{pi}	65
Figura 24 - Gráfico geral da distribuição dos resíduos ao longo da quantidade de analito adicionada. Figura adaptada de [59].....	66
Figura 25 - Gráfico de resíduo em função de C_i/C_{pi} , para a β -damascenona.	67

Lista de Abreviaturas

SBG	Super Bock Group
CUFP	Companhia União Fabril Portuense das Fábricas de Cerveja e Bebidas Refrigerantes
UNICER E.P	União Cervejeira
SMM	S-metil-metionina
DMS	dimetilsulfureto
EBI	Inspeção de garrafa vazia (<i>Empty Bottle Inspection</i>)
5-HMF	5-hidroximetifurfural
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
GC	Cromatografia Gasosa (<i>Gas chromatography</i>)
EI	Ionização por impacto de eletrões (<i>Electron Impact</i>)
TQ-MS	Espetrómetro de massa Triplo Quadrupolo

WCOT Coluna capilar com parede revestida (*wall coated open tubular column*)

SCOT Coluna capilar com fase estacionária depositada no suporte sólido (*supported coated open tubular column*)

PLOT Coluna capilar com camada porosa depositada na parede interna (*porous layer open tubular column*)

MCP Placa de microcanais (*Microchannel Plate*)

SPME Microextração de fase sólida (*solid phase microextraction*)

m/z Razão massa/carga

HS *Headspace*

ISO Organização Mundial de Normalização (*International Organization of Standardization*)

LOD Limite de deteção (*Limit of detection*)

LOQ Limite de quantificação (*Limit of quantification*)

S/N Sinal-Ruído (*Signal-to-noise Ratio*)

RSD Desvio padrão relativo (*Relative Standard Deviation*)

PFBHA O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)hidroxilamina

SIM *Selected Ion Monitoring*

MRM *Multiple Reaction Monitoring*

Introdução

1. Super Bock Group

Uma marca presente em mais de 50 países e que conta com mais de 1000 colaboradores, a Super Bock Group (SBG) é a empresa com maior influência na indústria de bebidas em Portugal, não se limitando apenas à indústria cervejeira (figura 1). Está presente também na indústria das águas engarrafadas, sidras, refrigerantes, vinhos, e até na área do turismo.

Tanto o Grupo VIACER como o Grupo Carlsberg detêm, respetivamente, 56% e 44% do capital da SBG, sendo o capital então maioritariamente português.

Ao longo dos anos, o SBG tem-se vindo a internacionalizar, marcando presença por toda a Europa, África, Ásia, América e Oceânia, num total de 56 países [1].

O início da história remonta a 1890, onde nasce a Companhia União Fabril Portuense das Fábricas de Cerveja e Bebidas Refrigerantes (CUFP), através de uma fusão de 7 empresas já existentes, localizadas na região do Porto. Depois de alguns passos modernizadores no aperfeiçoamento de técnicas, no transporte de mercadorias e no emprego de pessoal feminino, e também a Primeira Guerra Mundial, os primeiros prémios chegam em 1926, com medalhas de ouro para a Pilsener Crystal e Super Bock, na Exposição Industrial realizada no Palácio de Cristal. No ano seguinte, foi solicitado o Certificado de Registo da Marca Super Bock, e é aí que nasce realmente a marca Super Bock. Com o decorrer dos anos, e após uma grande evolução na produção, a década de 60 marca a mudança de instalações, com a construção de uma nova unidade fabril na Via Norte (Leça do Balio), em 1964, contando com a presença do Presidente da República à data, Américo Tomás. Com a nacionalização do setor cervejeiro português (devido à revolução do 25 de Abril), há uma nova reorganização de empresas, com a agregação das 5 empresas nacionalizadas em 2, com a formação da Centralcer – Central de Cervejas (através da reunião entre a Sociedade Central de Cervejas e a Cergal), e também da UNICER E.P. (União Cervejeira), a partir da junção da CUFP, COPEJA (Santarém) e a Imperial (Loulé). A empresa torna-se totalmente privada a partir de 1990, com a privatização do restante capital que ainda pertencia ao Estado. No início do novo século, a Empresa adquire o Grupo Vidago, Melgaço, Pedras Salgadas e Caféeira, nascendo assim a Unicer – Bebidas de Portugal, S.A.. Desde o início do século até ao seu 125º

aniversário (em 2015), vários lançamentos inovadores foram realizados, desde a Super Bock Stout, Super Bock Green, cervejas de teor artesanal (Seleção 1927: Munich Dunkel, Bavaria Weiss, Bengal Amber IPA, Czech Golden Lager), até às sidras (lançamento da Somersby). E por fim, em 2017, a Unicer passa a chamar-se oficialmente Super Bock Group [2].



Figura 1- Diferentes produtos disponibilizados pela marca, nas mais diversas áreas de produção. Imagens retiradas do site oficial da Super Bock.

2. Cerveja

2.1. História e a sua evolução

A cerveja é uma das bebidas mais populares no mundo inteiro. Existem diferentes estilos de cerveja provenientes de diferentes escolas (alemã, belga, inglesa e americana). Através dos ingredientes usados e do método de produção aplicado, cada região é capaz de dar um toque especial na sua bebida, produzindo cervejas com diferentes aromas e sabores.

Geralmente, a fruta (quando madura) liberta um aroma capaz de atrair qualquer espécie do reino animal, pois assim beneficia da ação dispersora das suas sementes, após a sua ingestão pelos animais. Ou seja, tanto o animal sai beneficiado devido ao valor nutritivo que esse dado alimento maduro oferece, como o fruto beneficia das suas sementes serem dispersas. Dado que o fruto maduro geralmente contém altos níveis de açúcares, é possível que ele se torne de certa forma alcoólico, aquando da presença de leveduras que podem estar presentes no alimento. Com isso, um dos pontos fulcrais que foi preciso entender desde início foi o funcionamento desse mecanismo, a partir do qual o açúcar é utilizado e transformado em álcool, e regular esse processo até ter um produto final com qualidade [3].

Acredita-se que o entendimento desses mecanismos possa ter começado entre o ano de 9500 e 6000 a.C., altura que coincidiu com a fundação de grandes povoações ao longo do Crescente Fértil (Médio Oriente), do rio Nilo (África) e dos rios Amarelo e Yangtzé (Ásia), e com a domesticação tanto de plantas como animais [4]. Com isto, os primeiros indícios reais da criação da cerveja remontam a 4000 anos a.C., a partir de vestígios de cerâmica, jarros e resíduos encontrados em escavações antigas, na Mesopotâmia, na civilização do povo Sumério [5].

Beneficiando de trocas comerciais entre povos, os egípcios aperfeiçoaram a receita, sendo a cerveja vendida em espaços públicos e exportada através do Mar Mediterrâneo [6]. Como era comum nessa época a moeda de troca em negócios ser o próprio grão (utilizado na produção da cerveja), isso fez com que houvesse uma melhoria na alimentação egípcia, mais especificamente no pão e na cerveja, e que também evoluíssem em termos de força económica [6].

Anos mais tarde, e com as sucessivas conquistas do império romano pela Europa a fora, o vinho começou a ser produzido em grande escala e a ser consumido apenas por pessoas de classe alta, deixando a cerveja a ser maioritariamente produzida e consumida pela classe baixa e média. A expansão do império romano no século IX, levou ao incentivo da construção de vários mosteiros por toda a Europa. Os mosteiros situados no Norte e Leste da Europa (populações germânicas e celtas, respetivamente) eram as zonas onde predominantemente se produzia mais cerveja, talvez pelo próprio clima mais frio que se fazia sentir, ajudando no cultivo de cevada. Os monges fabricavam a cerveja, e usavam-na tanto para consumo próprio como para oferecê-la a visitantes, peregrinos ou hóspedes [7]. Séculos mais tarde, e com a popularidade da cerveja a crescer entre as classes, os monges passaram a vendê-la à classe nobre, tornando o fabrico da cerveja uma atividade comercial e rentável. A popularidade do consumo da cerveja também aumentou devido às más condições de higiene e saneamento existentes na Idade Média. Nessa época, a água estava tão poluída, que seria mais saudável consumir cerveja do que a própria água.



Figura 2 - Mosteiro de Weltenburg, situado no rio Danúbio, na Baviera. Uma das cervejeiras monásticas mais antigas do mundo. Fotografia da autoria de Val Thoermer (retirado de <https://www.theguardian.com/travel/2016/dec/14/dark-beer-bavaria-oldest-monastic-brewery-in-world-weltenburg-abbey-germany>).

Nessa mesma época foi introduzido, em mosteiros alemães, o lúpulo no processo de fabrico da cerveja, com o intuito de balancear o sabor doce proveniente do malte e

também preservar a própria cerveja. A inovadora adição do lúpulo veio a espalhar-se lentamente por toda a Europa, vindo a substituir outras técnicas de aromatização e de adição de amargor.

Um marco importante na história da indústria cervejeira foi a implementação de uma das leis de segurança alimentar mais antigas do mundo, em 1516: *Reinheitsgebot*, ou seja, “Lei de Pureza”. Esta lei promulgada na Baviera limitava a produção de cerveja apenas a três ingredientes, sendo eles água, lúpulo e malte (de cevada). Ao longo dos anos, esta lei foi sofrendo adaptações ao longo dos anos, permitindo, por exemplo, a utilização de lúpulo em pó ou de agentes estabilizantes e/ou clarificantes. Se a cerveja for de alta fermentação (temperaturas de fermentação mais elevadas com levedura floculada na superfície dos tanques de fermentação), então é possível utilizar outros tipos de malte para além do malte de cevada [8].

Com a Revolução Industrial, veio também a mecanização de todo o processo cervejeiro. Rapidamente se espalhou de Inglaterra para o resto da Europa, o que permitiu um melhor controlo do processo, nomeadamente dos equipamentos de refrigeração. Também no final do século XIX, as descobertas de Louis Pasteur permitiram grandes desenvolvimentos na indústria cervejeira, nomeadamente no processo de fermentação e na implementação do processo de pasteurização. Já Emil Hansen, em 1883, conseguiu conceber pela primeira vez um método que isolasse uma célula de levedura, isenta de bactérias e de outras leveduras indesejáveis. Foram passos importantes e adotados para a obtenção de um produto melhorado, purificado e constante ao longo de todo o processo [9].

2.2. Processo cervejeiro

Para a criação da cerveja, é preciso que alguns elementos passem por diversos processos que transformem a matéria-prima no produto final que conhecemos. De um modo simples, o objetivo será converter o amido dos cereais em cadeias mais simples de açúcares, para depois estes açúcares serem utilizados pela levedura e haver a fermentação alcoólica, com a conversão de açúcar em etanol, produzindo um produto final gaseificado e com um dado teor de álcool.

O processo inicia-se com a **maltagem**, com a transformação dos grãos de cereal em malte. Geralmente, a cevada é o cereal utilizado na maltagem. Ainda assim, é possível utilizar outros tipos de malte, como o de centeio, aveia, trigo, chocolate, caramelo, entre muitos outros. Este processo de maltagem tem como objetivo produzir e ativar as enzimas que são capazes de encurtar os polímeros do amido em cadeias mais curtas, para que possam ser utilizadas pela levedura na etapa de fermentação [10]. Para que haja essa ativação, é necessário o grão passar pelas etapas de molha, germinação e secagem. Na etapa de molha, o grão é primeiramente limpo e depois embebido em água, entre 1 e 2 dias, seguido de incubação, para se dar a germinação durante 4 a 5 dias. É nesta etapa de germinação que se formam enzimas capazes de converter o amido em cadeias mais simples de açúcar, sendo estas enzimas a α -amilase, a β -amilase e outras proteases. Em seguida, na etapa de secagem, a germinação é interrompida devido à remoção da água e à consequente inibição de todas as reações a nível enzimático [11]. De notar que esta secagem pode levar à produção de substâncias que produzam cor e sabor. Se a secagem for feita por um tempo excessivo, ou se for usada uma temperatura muito elevada, pode verificar-se uma atividade enzimática desregulada, que poderá alterar o conteúdo em açúcares e levar a um produto final diferente [11].

Após a maltagem, é necessário recorrer à **moagem**, processo que é mecânico e que leva à trituração dos grãos. O objetivo desta etapa é quebrar os grãos do malte para expor o amido, e libertar as enzimas formadas na etapa da germinação. A moagem tem de ser feita tendo em conta um certo equilíbrio, pois as cascas devem ser o menos esmagadas possível, para evitar aparecimentos de compostos amargos na cerveja que poderão alterar o seu sabor [12]. Ainda assim, os processos de

moagem poderão ser diferentes de acordo com os processos utilizados na filtração do mosto.

A seguir, dá-se a etapa da **brassagem**, em que o grão moído da etapa anterior é misturado com água quente, para que todo o amido se degrade em cadeias de açúcar simples, através da ação das enzimas produzidas para o efeito. Aqui, a temperatura e o pH vão determinar o grau da atividade enzimática. A maior parte dos produtores utilizam, na brassagem, uma infusão com temperatura programada, ou seja, utilizam rampas de aquecimento definidas e específicas, repousando o mosto um dado tempo, para depois voltar a aumentar a temperatura. O aquecimento do mosto é feito através da passagem de vapor ou de água quente, por painéis de aquecimento localizados no tanque de mistura. A rampa de aquecimento começa com a mistura do malte triturado e da água numa temperatura de 45 a 50 °C numa cuba. Esta temperatura é mantida entre 10 e 25 minutos, para que as proteases possam atuar sobre as proteínas, podendo libertar os grânulos de amido. As proteínas são decompostas, formando aminoácidos, sendo estes nutrientes necessários para as leveduras utilizarem mais tarde na fermentação. Algumas proteínas também podem contribuir para a formação de uma espuma estável na cerveja. Um período demasiado longo de repouso pode levar a uma má qualidade da espuma. Depois do primeiro repouso, a mistura é aquecida entre 62 °C e 67 °C, pois as amilases funcionam com maior eficiência neste intervalo, para a conversão do amido em açúcares fermentáveis. Assim como diferentes maltes podem dar origem a diferentes cervejas, diferentes temperaturas de sacarificação para o mesmo malte vão originar diferentes cervejas devido à proporção de açúcares fermentáveis diferentes. A última rampa de aquecimento será aquecer a mistura a 75 °C, antes de a transferir para um recipiente diferente. Esta temperatura fará com que as enzimas fiquem inativadas e que estabilize a concentração de açúcares na mistura [13].

Em seguida, recorre-se à **filtração do mosto**. Nesta fase, dá-se a separação do mosto líquido (que será utilizado para ferver mais adiante) dos precipitados sólidos, principalmente grãos de cereais que foram utilizados devido ao seu conteúdo proteico e de amido. O precipitado de grãos (dreche) que é filtrado pode ser reaproveitado para a produção de ração alimentar para animais [14].

Com o mosto filtrado do passo anterior, procede-se à sua **ebulição**. O mosto é aquecido lentamente até atingir o ponto de ebulição. O mosto ferve a cerca de 100 °C, entre 1 a 2 horas. Durante a fervura, é adicionado o lúpulo, que confere amargor, sabor e aroma caraterísticos. Os objetivos principais da ebulição do mosto são: a

xinterrupção da atividade enzimática por completo (a inativação enzimática já começa no processo de brassagem); a esterilização do mosto através da eliminação de microrganismos (criando assim um bom ambiente para a ação da levedura); isomerização dos α -ácidos em iso- α -ácidos responsáveis pelo sabor amargo da cerveja; a evaporação de compostos voláteis precursores, como a S-metil-metionina (SMM), que daria origem ao dimetilsulfureto (DMS), e iria conferir notas desagradáveis ao produto final e a formação de aglomerados e precipitados de proteínas no mosto devido à alta temperatura [15].

A seguir à ebulição, dá-se a etapa da **clarificação** do mosto, onde se remove os aglomerados e precipitados de proteínas (também chamados de *trub*). Nesta fase, o mosto é bombeado rapidamente num tanque, criando um efeito de *whirlpool* (turbilhão ou redemoinho) devido à força centrífuga imposta. Desta forma, forma-se um cone no centro do tanque com o depósito do *trub* insolúvel e o lúpulo, enquanto o mosto vai sendo "clareado" e bombeado para o próximo tanque (de fermentação) [16]. Para que possa ser adicionada a levedura, o mosto irá ser arrefecido para temperaturas entre os 7 °C e os 35 °C (dependendo do estilo de cerveja), por um permutador de calor. Finalmente, antes de seguir para a fermentação, o mosto é "arejado" através da adição de oxigénio esterilizado, com o objetivo de promover a reprodução e o crescimento celular das culturas de leveduras [16].

Seguidamente, dá-se um dos passos vitais na produção de cerveja: a **fermentação**. A adição inicial da levedura poderá ser chamada também de fermentação primária. Esta irá ser a etapa onde os açúcares serão finalmente convertidos em álcool e dióxido de carbono. As leveduras são fungos unicelulares capazes de transformarem a sua matéria-prima em produtos metabolizados importantes para a cerveja final, mais notoriamente o álcool. Portanto, é importante haver um controlo rigoroso de fatores como o teor de oxigénio do mosto, a quantidade e qualidade da levedura, a temperatura e o tempo enquanto a fermentação ocorre. O mosto previamente arrefecido é transferido para um fermentador industrial (ao qual já foi adicionado a levedura). Dependendo do estilo de cerveja fabricada, o mosto será mantido durante temperaturas e tempos diferentes. Para uma cerveja estilo *Alé*, é mantido a 20 °C, por cerca de três a cinco semanas. Já se for estilo *Lager*, será mantida a uma temperatura mais baixa (9 °C) durante 6 a 8 semanas. Para cada estilo, são utilizadas diferentes estirpes: Na *Alé*, a levedura utilizada (estirpe *Saccharomyces cerevisiae*) é de alta fermentação, pois, para além de utilizar temperaturas de fermentação mais altas, flocula no topo do tanque do fermentador

após terminar a fermentação. Já na *Lager*, a estirpe geralmente utilizada é a *Saccharomyces pastorianus*, conhecidas por serem leveduras de baixa fermentação, pois permanecem no fundo do fermentador no fim do processo e utilizarem temperaturas de fermentação mais baixas [17]. Como a fermentação gera calor, os fermentadores são arrefecidos regularmente, para que a temperatura desejada não se altere. O valor da gravidade específica medida no mosto irá determinar a quantidade de álcool na cerveja, e assim, o momento em que se deve cessar a fermentação. O fermentador tem de ser vedado, para garantir uma pressão constante dentro do tanque. Visto que a fermentação produz dióxido de carbono, existe um tubo de ventilação no tanque capaz de extrair, com um certo fluxo, o dióxido de carbono formado, regulando assim a sua carbonatação. Apenas uma pequena parte do dióxido de carbono (sem ser da fermentação) é adicionado *a posteriori*. Quando a fermentação fica completa, a levedura que se deposita ou que flocula em cima poderá ser capturada, guardada e reutilizada nos próximos fabricos, enquanto for viável (microbiologicamente). Após a fermentação, a cerveja é arrefecida até 0 °C, para ajudar a agregar e a retirar toda a levedura e outro tipo de proteínas insolúveis. Posteriormente, a cerveja é bombeada do fermentador para o chamado tanque de cerveja filtrada, passando por um filtro. Esta **filtração** irá ajudar tanto na estabilização físico-química (efeito da turvação) como microbiológica (eliminação de leveduras e bactérias). A filtração pode-se dar de diversas formas, sendo as mais recorrentes as que utilizam terra de diatomáceas ou kieselguhr (restos fossilizados de algas marinhas, composto quase inteiramente por sílica), membranas de celulose, discos lenticulares, entre outros. Em cada tipo de filtração irá variar a porosidade e a permeabilidade dos filtros, que podem ser escolhidos de acordo com o tipo de cerveja e com o teor de sólidos em suspensão existentes [18].

Finalmente, após a filtração, a cerveja poderá seguir para **enchimento**. As garrafas, novas ou recicladas, passam por pulverizações e limpezas com soluções cáusticas seguidas de água limpa, para remover quaisquer tipos de resíduos no seu interior e exterior. Depois, são inspecionadas ou visualmente ou através de uma máquina (EBI – Inspeção de garrafa vazia) que deteta vestígios líquidos, sólidos ou qualquer tipo de sujidade. Poderão existir ajustes na concentração de CO₂, para que os seus níveis estejam de acordo com o regulado, e também para que se retire todo o oxigénio que possa existir dentro da garrafa após o enchimento. Por fim, antes das garrafas serem rotuladas, a cerveja é sujeita a pasteurização, que é um tratamento térmico, onde as garrafas irão ser sujeitas a um chuveiro de água, com rampas de

temperatura controladas. Esta etapa tem o objetivo de destruir quaisquer microrganismos vivos que ainda possam existir, tornando assim a cerveja estável microbiologicamente [19,20]. Efetuando todos estes passos, a garrafa está pronta a ser rotulada, embalada, e pronta a ser utilizada pelo consumidor.

3. Compostos Voláteis

Para o consumidor comum, cada detalhe a nível sensorial na experiência de beber uma cerveja conta. Não passa só por apreciar o produto pelo sabor ou aparência, mas também pelo aroma que oferece. Esse perfil aromático advém de vários metabolitos secundários que são formados durante o processo de produção da cerveja, principalmente na fermentação. Mesmo em baixas concentrações (em relação aos metabolitos principais: etanol e dióxido de carbono), estes metabolitos secundários são os responsáveis pelo aroma complexo que a maioria das bebidas fermentadas apresenta. Diferentes processos, matérias-primas utilizadas, diferentes regulações de temperatura e tempo no processo irão ser alguns dos pontos fulcrais que fazem com que um produto final se diferencie de outro. Ora, produtos finais diferentes têm perfis aromáticos diferentes, promovendo diferentes sensações no momento do seu consumo [21].

3.1. Classes de compostos voláteis

Várias classes de compostos podem estar associadas a compostos voláteis, nomeadamente: os compostos carbonílicos, os ésteres, os ácidos gordos, os álcoois de cadeia longa, os compostos com enxofre, os fenóis voláteis, os compostos furânicos, entre outros [21]. Algumas destas classes estão exemplificadas na figura abaixo.

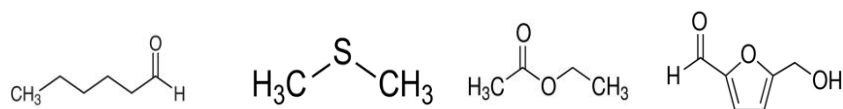


Figura 3 - Exemplos de estruturas químicas das classes de compostos voláteis presentes na cerveja. Da esquerda para a direita: Compostos carbonílicos (hexanal); Compostos com enxofre (dimetilsulfureto); Ésteres (acetato de etilo); Compostos furânicos (5-hidroximetilfurfural).

Por exemplo, os grupos éster estão ligados ao processo de fermentação e ao metabolismo lipídico. A sua presença na cerveja pode-se dar ao facto de os ésteres de cadeia longa serem formados dentro das células de levedura em fermentação, difundindo-se através da membrana celular até ao meio onde está a levedura presente. Os grupos éster estão presentes numa concentração considerável no produto final, tendo um impacto também no aroma da cerveja, e tendem a oferecer um carácter floral e frutado à cerveja (aromas a banana, rosa, mel, maçã, etc.) [21,22]. No que diz respeito aos álcoois de cadeia longa, estão associados diretamente ao metabolismo dos aminoácidos, que são usados como fonte de azoto durante a fermentação. Se estiverem presentes em altas concentrações, podem originar aromas herbáceos e gordurosos desagradáveis no produto final [21]. Os compostos sulfurados voláteis, apesar de importantes e de contribuírem de forma positiva em vários tipos de alimentos como a cebola, o alho e o alho francês, são associados negativamente à cerveja. O DMS é um desses compostos, que apresenta limiares sensoriais baixos e que confere traços desagradáveis a milho cozido [23]. O seu precursor, SMM, tem tendência a estar presente em maltes claros, e o processo de transformação dá-se devido ao aquecimento (geralmente na maltagem e na fervura do mosto). Ainda assim, boas práticas como o armazenamento adequado do malte, a higienização adequada, ou realização de uma fermentação rápida após arrefecer o mosto podem ajudar a controlar a concentração de DMS. Quanto aos compostos carbonílicos, como aldeídos e cetonas, estão presentes em concentrações mais baixas relativamente às classes anteriormente referidas. Podem ser formados durante a preparação do mosto através de reações de Maillard e/ou oxidação lipídica, ou então através de vias anabólicas e catabólicas durante o metabolismo da levedura [21]. Dependendo das vias de formação dos compostos, do armazenamento, da exposição

ao oxigénio e da temperatura a que a cerveja é sujeita, a produção destes compostos pode ser desregulada, levando ao aparecimento de “*off-flavours*”, que marcam negativamente a cerveja e deixam um aroma desagradável e indesejável ao consumidor. Todos estes processos irão ser mencionados nos capítulos à frente.

3.2. Origem dos compostos

A formação destes compostos voláteis que vão ter participação ativa no aroma podem ter diferentes origens: 1) matérias-primas; 2) produtos do metabolismo da levedura; 3) microrganismos; 4) estabilidade durante o armazenamento. Quanto às matérias-primas, produtos como o malte e o lúpulo vão ter influência na formação de *off-flavours*. A preferência por produtos frescos é natural, visto que produtos envelhecidos estão associados a aldeídos indicativos de envelhecimento, originando compostos instáveis e aromas desagradáveis. Estes podem-se formar, por exemplo, durante o processo de germinação, quando as lipoxigenases oxidam os lípidos da cevada, originando compostos que são seguidamente degradados em aldeídos. Outro exemplo, é a ativação de enzimas como as redutases de aldeídos, que podem ter um papel importante na conversão do aldeído no seu correspondente álcool [21]. No segundo grupo, é através do metabolismo dos carboidratos e aminoácidos que se formam os metabolitos voláteis como grupos ácidos, álcoois e ésteres. Estes podem ser utilizados para monitorizar o metabolismo da levedura ao longo do processo para, por exemplo, regular o nível de absorção dos aminoácidos pelas leveduras (através da monitorização de um dos principais metabolitos voláteis nas cervejas, o 3-metil-butanol) [24]. Os microrganismos podem também ser responsáveis pela formação desses compostos voláteis. Apesar da cerveja ser um meio pouco favorável para a maioria dos microrganismos (devido à presença de etanol, ao alto teor de dióxido de carbono e ao pH baixo), algumas bactérias gram-positivas, gram-negativas e leveduras selvagens podem deteriorar a cerveja, alterando as suas propriedades físico-químicas. Por exemplo, as bactérias gram-positivas do género *Lactobacillus* e *Pediococcus* são bactérias produtoras de ácido láctico. Estas bactérias representam

cerca de 70% da deterioração da cerveja quando causadas por microrganismos. Exemplos dos organismos que podem causar algum tipo de deterioração na cerveja são *Lactobacillus brevisimilis*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus damnosus*, *Pediococcus inopinatus*, *Acetobacter aceti*, entre outros. Algumas destas bactérias podem fazer desregular o perfil aromático cervejeiro, dando origem a *off-flavours* de sabor a mel, ou com notas avinagradas (devido à conversão de etanol em ácido acético, por parte das bactérias da família *Acetobacter aceti*) [21]. Por fim, podem ocorrer alterações tanto na vertente microbiológica, na cor, no aroma ou no sabor, caso não haja estabilidade no armazenamento do produto. Mesmo com os devidos prazos de validade estipulados, o envelhecimento da cerveja não é um fator realmente controlável, principalmente quando as condições de armazenamento, embalagens, temperatura e luz solar não são as ideais [25]. A oxidação da cerveja (com a presença de oxigénio) provoca tendencialmente aromas de cartão/papel [26], enquanto a luz solar pode levar à foto-oxidação de lípidos provenientes do lúpulo, originando um aroma a ranço [27].

4. Aldeídos

4.1. Importância e impacto no produto

Na década de 60 do século passado, alguns investigadores olharam para a cerveja envelhecida e para os aldeídos de uma outra perspetiva. *Hashimoto et al* observou e correlacionou a cerveja envelhecida (e com características *off-flavours*) com o aumento dos compostos carbonílicos. Ele comprovou essa correlação quando efetuou a adição de hidroxilamina e notou que os compostos associados a *off-flavours* eram parcialmente eliminados, pois a hidroxilamina reagia com os aldeídos, formando oximas [28]. Até aos dias de hoje, fortaleceu-se a teoria que relaciona a formação de *off-flavours* na cerveja com uma maior concentração de aldeídos presentes. Quando estes aldeídos se concentram no produto e se fazem sentir, significa que a sua concentração está acima dos limiares de perceção sensorial do consumidor, notando-se as tais notas “envelhecidas”.

Apesar destes compostos carbonílicos, na maioria dos casos, se encontrarem em baixas concentrações, estes têm baixos limiares sensoriais. O seu estudo é realmente necessário quando se pretende obter um processo cervejeiro repetível e uma cerveja com um perfil aromático agradável, pois estes são biomarcadores que traduzem as reações que estão a acontecer durante o envelhecimento e que percebemos quando consumimos o produto.

4.2. Perfil sensorial e limiares sensoriais

A perceção do sabor, também conhecida como *flavour*, pode ser definida como a combinação de estímulos sensoriais recebidos pelos receptores nervosos presentes na cavidade bucal e nasal quando um alimento passa pelo trato respiratório e digestivo. Pode ser compreendida como uma fusão de diferentes fatores, incluindo o aroma e o sabor. Geralmente, a perceção do sabor é resultado da interação entre o sentido olfativo (aroma) e o sentido gustativo (gosto). De maneira simplificada, o sabor pode ser representado como a soma do aroma e do gosto: $\text{sabor} = \text{aroma} + \text{gosto}$. A

presença de determinadas substâncias pode influenciar a intensidade da percepção de outras substâncias, amplificando ou diminuindo essa percepção. Assim, efeitos sinérgicos e supressores são observados quando a intensidade de uma mistura de vários compostos é aumentada ou reduzida, respetivamente [29]. A similaridade entre os sabores e aromas dos compostos tem mais impacto no efeito sinérgico do que a semelhança química e estrutural entre eles.

Na tabela 1, estão representados os aldeídos (exceção da β -damascenona, que é uma cetona) em estudo, com os respetivos limiares de percepção, juntamente com alguns efeitos e características sensoriais perceptíveis na cerveja. As informações utilizadas na tabela 1 foram retiradas dos trabalhos de *Jeroen Baert et al (2012)*, *Nick Huige et al (1993)*, *Harrison et al (1970)* e *Daan Saison et al (2008)* [26, 29-31].

Tabela 1 - Aldeídos em estudo, respetivos limiares sensoriais (concentração em $\mu\text{g/L}$, à pressão de 1 atm) e características sensoriais. Limiares sensoriais retirados de ^[1] Nick Huige et al [26], ^[2] Jeroen Baert et al [29], ^[3] Harrison et al [30], ^[4] Daan Saison et al [31]

Aldeídos	Limiar sensorial ($\mu\text{g/L}$)	Caraterísticas sensoriais
isobutiraldeído	1000 ^[3]	Verniz, afrutado
2-metilbutanal	45 ^[2]	Amêndoa, maçã, amaltado
pentanal	500 ^[1]	Herbáceo
hexanal	88 ^[2]	Amargo, vinho
β -damascenona	203 ^[4]	Maçã, rosas, mel
nonanal	15 ^[1]	Adstringente, cítrico
furfural	50000 ^[3]	Caramelo, pão, carne cozida
(E)-2-octenal	0,3 ^[1]	Amargo, envelhecido
metional	4,2 ^[2]	Batata cozida, mosto
(E)-2-nonenal	0,03 ^[2]	Cartão, papel molhado
benzaldeído	515 ^[2]	Amêndoa, cereja
(E,E)-2,4-nonadienal	0,05 ^[1]	Ranço, óleo de fritar

4.3. Mecanismos de formação dos aldeídos

As origens para a formação dos aldeídos podem ser diversas: podem partir de reações químicas ou derivar das matérias-primas utilizadas. Por exemplo, o malte pode fornecer diretamente os aldeídos, mas também pode conter vários precursores que se irão transformar e originá-los de outra forma [32].

Alguns precursores são essenciais para serem utilizados como substrato nas reações e formarem os compostos carbonílicos, sendo alguns destes, por exemplo, os aminoácidos, os açúcares, os ácidos gordos insaturados, os compostos α -dicarbonílos, entre outros [32]. Alguns destes compostos irão participar, geralmente, em reações induzidas por calor ou em oxidações lipídicas, como se verificará a seguir.

4.3.1. Degradação de Strecker

Esta via consiste numa reação de transaminação por parte de um aminoácido e um α -dicarbonilo. Esta reação origina uma α -cetoamina e um aldeído de Strecker. O aldeído de Strecker formado irá conter um átomo de carbono a menos na sua estrutura, comparativamente ao aminoácido que o originou. A reação é iniciada quando ocorre uma adição nucleofílica do grupo amina desprotonado ao grupo carbonilo, passando por um processo de descarboxilação, seguida de uma adição de água, resultando num aminoálcool instável. Este decompõe-se, dando origem a uma α -cetoamina e um aldeído de Strecker [29]. Esta reação está traduzida abaixo, na figura 4.

Alguns aminoácidos como valina, isoleucina, leucina, metionina, e fenilalanina são exemplos de precursores utilizados na reação, originando respetivamente aldeídos de Strecker como o isobutiraldeído, 2-metilbutanal, 3-metilbutanal, metional, fenilacetaldeído, entre outros [33].

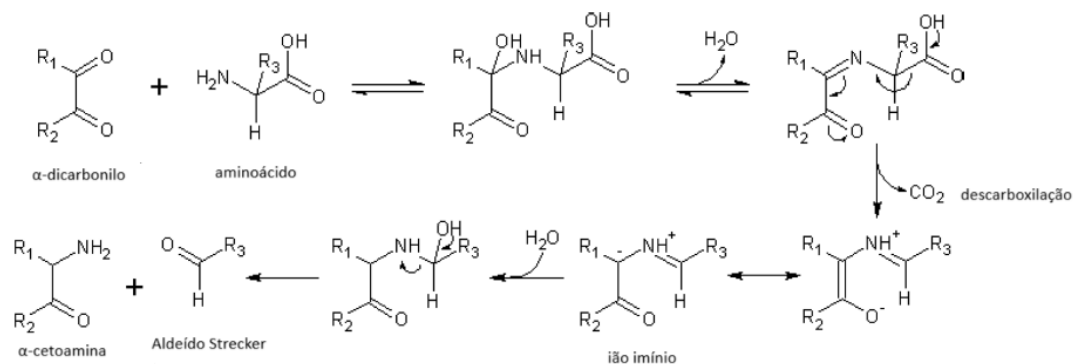


Figura 4 - Reação geral da degradação de Strecker. Figura adaptada de Baert et al (2012).

Reações semelhantes à degradação de Strecker podem acontecer quando, em vez do α -dicarbonilo ser utilizado na reação, o substrato for um composto α -carbonílico insaturado. Aldeídos provenientes de outras vias, como o (*E*)-2-nonenal, (*E*)-2-octenal ou furfural, podem reagir com o aminoácido correspondente, para se dar a degradação e a formação de um novo aldeído. Na figura 5, está representada a reação-base de uma variação da Degradação de Strecker.

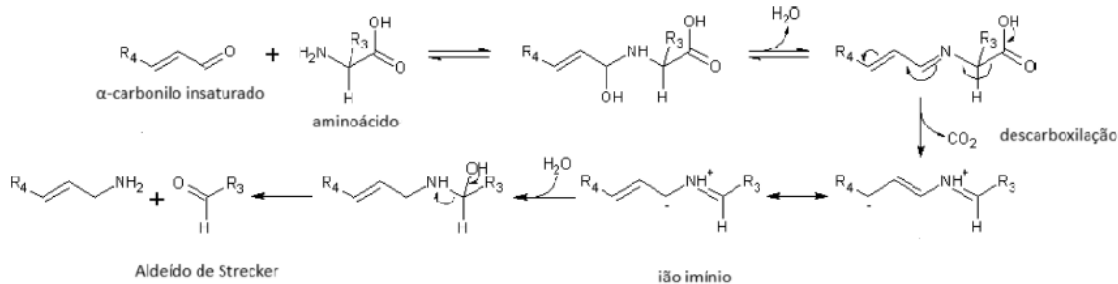


Figura 5 - Variação da reação geral da degradação de Strecker. Figura adaptada de Baert et al (2012).

4.3.2. Reações de Maillard

Também chamadas de reações de escurecimento não-enzimático, estas reações acontecem aquando da presença de um açúcar redutor com grupos amina de um aminoácido, que pode estar na forma peptídica ou proteica [29,34]. São reações comumente associadas à aplicação de calor e ao ganho de cor do composto. Geralmente iniciam-se quando a temperatura é de, no mínimo, 50 °C, dentro de uma faixa de pH de 4 a 7 [29]. Em geral, o furfural e o 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) são os compostos heterocíclicos mais importantes, originados por esta via. Irão ser importantes marcadores de calor (na fervura do mosto), assim como um marcador de envelhecimento da cerveja. Sucintamente, as reações iniciam-se com a reação do grupo carbonilo do açúcar (em forma de aldose, seja pentose ou hexose) com o grupo amina de um aminoácido, resultando numa imina ou base de Schiff. Esta imina, com a ajuda da temperatura, sofre rearranjos para uma estrutura mais estável (rearranjo Amadori) e, dependendo das condições pH, esta pode produzir diferentes dicetonas vicinais. Em condições de pH alto, a 1-desoxiosona e 4-desoxiosona levam à formação de redutonas (agentes redutores fortes). No caso de condições ácidas, a 3-desoxiosona é formada, sofre uma desidratação e ciclização, tendo como produto furfural ou 5-HMF, no caso de uma pentose ou uma hexose, respetivamente. Esta cascata de reações (figura 6) está explicada ao detalhe nos trabalhos de investigação de *Baert et al (2012)* e *Mutz et al (2020)* [29,34].

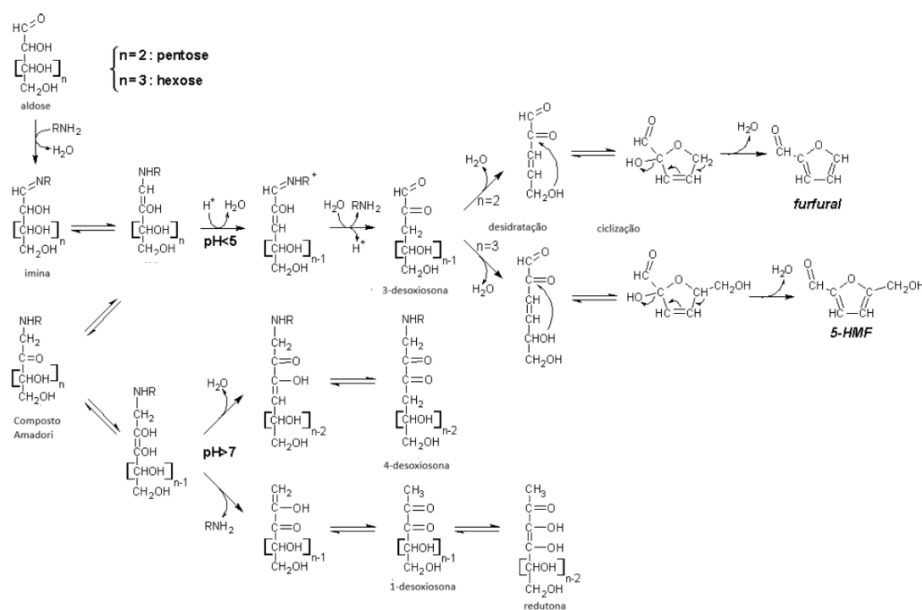


Figura 6 – Variação da Reação de Maillard, com furfural e 5-HMF como produto. Adaptação do artigo *Baert et al (2012)*.

4.3.3. Oxidação Lipídica

Os ácidos gordos insaturados são um dos componentes presentes nos grãos de malte, que podem sofrer reações de oxidação. Os ácidos gordos como o ácido linoleico, ácido linolénico, ácido oleico ou o palmítico podem ser encontrados na cerveja e utilizados como substrato (principalmente o ácido linoleico e o ácido linolénico) durante o processo de transformação [29]. As lipases ligadas às membranas atuam nas estruturas de triacilglicerol, e libertam os ácidos gordos por via de hidrólise das ligações éster [34]. Assim, os ácidos gordos livres são suscetíveis à oxidação (com formação de hidroperóxidos de ácidos gordos), geralmente através de três vias: via enzimática, autooxidação ou foto-oxidação.

Em reações enzimáticas de oxidação dos lípidos, os ácidos gordos do malte (geralmente ácido linoleico e ácido linolénico) sofrem oxidações por parte de lipoxigenases (LOX-1 e/ou LOX-2), resultando em ácidos hidroperóxidos (9-LOOH e 13-LOOH, respetivamente). Estas lipoxigenases vão ter diferentes atividades no malte, de acordo com as condições em que estão inseridas. Por exemplo, a LOX-1 é termicamente mais estável e já está presente no cereal, enquanto a LOX-2 só se forma durante a germinação (não está inicialmente presente no cereal) [29]. Estes ácidos hidroperóxidos degradam-se, formando compostos carbonílicos. Isto só acontece porque esta via é catalisada por enzimas, a altas temperaturas e na presença de oxigénio [29,33]. Na figura 7, está sucintamente descrita a reação de oxidação enzimática.

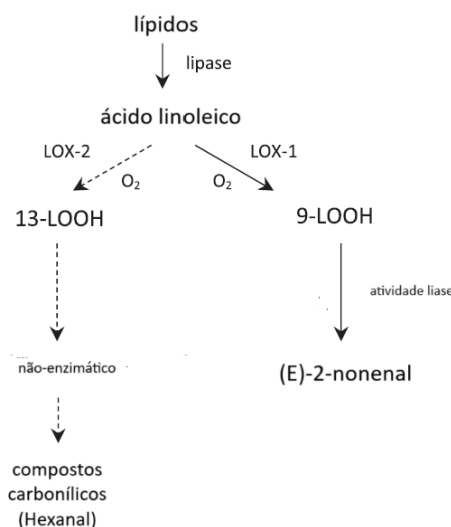


Figura 7 - Reação enzimática de oxidação lipídica. Figura adaptada de Filipowska et al (2020) [33].

Geralmente, a via LOX-2 que origina o ácido hidroperóxido 13-LOOH vai originar o hexanal, enquanto a via LOX-1 forma o hidroperóxido 9-LOOH, tendo como produto o (*E*)-2-nonenal.

Na via de autooxidação, as espécies reativas de oxigénio promovem a oxidação dos lípidos, com formação de hidroperóxidos lipídicos. A reação inicia-se quando um átomo de hidrogénio fracamente ligado ao ácido gordo insaturado é retirado por parte da ação de um radical livre, produzindo radicais lipídicos. Esses radicais podem reagir com outros lípidos insaturados, levando a uma onda de propagação com formações de radicais peroxilo. Estes radicais peroxilo podem auxiliar na propagação de radicais, ou reagir com o ácido gordo insaturado, levando à formação de hidroperóxidos lipídicos [29,33]. Novamente, a degradação dos ácidos hidroperóxidos 9-LOOH e 13-LOOH podem levar à formação de (*E*)-2-nonenal e hexanal, respetivamente. A presença de oxidantes (iões de metais de transição), condições acídicas de pH, enzimas, oxigénio, espécies reativas de oxigénio e altas temperaturas são fatores cruciais para esta reação acontecer [33].

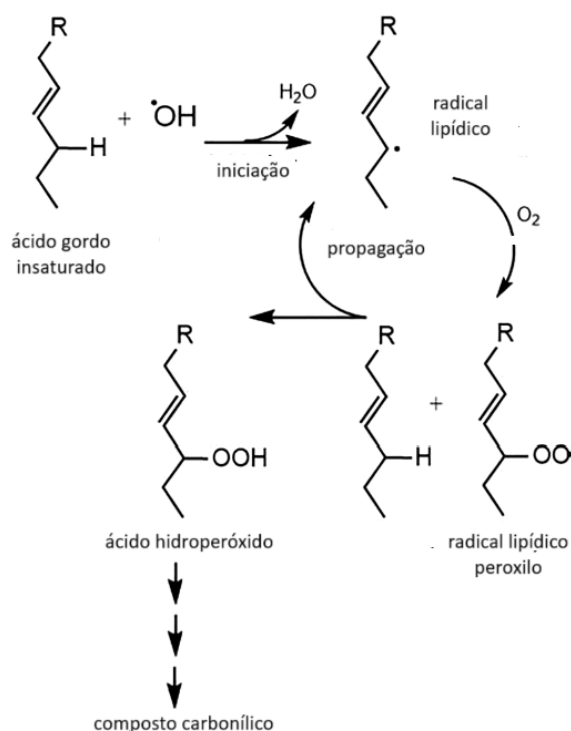


Figura 8 - Reação de autooxidação lipídica. Figura adaptada de Filipowska *et al* (2020).

Por último, a foto-oxidação de ácidos gordos insaturados acontece quando há uma ativação de espécies reativas de oxigénio através da radiação luminosa mediada por compostos fotossensíveis, como a riboflavina (vitamina B2). As espécies ativadas excitam o oxigénio em estado tripleto para estado singleto, que pode por sua vez reagir com os lípidos e formar aldeídos e precursores de aldeídos. A temperatura não tem relevância nesta reação. Sem a presença da luz, esta reação não acontece. Para além disso, a cerveja é embalada em garrafas com cor (geralmente verdes ou de cor âmbar) para limitar a passagem da luz [29], não tendo esta reação tanta relevância nos dias de hoje.

As três vias anteriormente mencionadas (degradação de Strecker, reação de Maillard e oxidação lipídica) são as mais comuns na formação de compostos carbonílicos. Ainda assim, existem ainda outros mecanismos de formação de aldeídos, tais como a condensação aldólica, oxidação por catálise de álcoois de cadeia longa ou a degradação de ácidos amargos (iso- α -ácidos provenientes do lúpulo) [29,33,34]. Porém, não serão explorados de momento.

Tabela 2 - Tabela-resumo dos aldeídos em estudo e dos respetivos mecanismos envolvidos na sua formação

Aldeídos	Mecanismos envolvidos
isobutiraldeído	Degradação de Strecker
2-metilbutanal	Degradação de Strecker
pentanal	Oxidação lipídica
hexanal	Oxidação lipídica
nonanal	Oxidação lipídica
furfural	Reações de Maillard
(E)-2-octenal	Oxidação lipídica
metional	Degradação de Strecker
(E)-2-nonenal	Oxidação lipídica
benzaldeído	Degradação de Strecker
(E,E)-2,4-nonadienal	Oxidação lipídica

A β -damascenona, apesar de ser também um composto carbonílico, não é proveniente de nenhum dos mecanismos citados, pois ela é uma cetona. O mecanismo que envolve a sua formação na cerveja tem sido investigado até aos dias

de hoje. Porém, acredita-se que a sua formação tenha origem na transformação e degradação térmica de precursores presentes no lúpulo (como iso- α -ácidos e iso- β -ácidos), durante o processo de fervura do mosto [35]. Na tabela 2, estão elucidados os mecanismos mais comuns para cada um dos compostos utilizados no presente método.

4.4. Aldeídos livres e ligados

Na literatura, é inequívoca a importância dos aldeídos como marcadores naturais de envelhecimento. Já foi observado também que estes aldeídos são produzidos ao longo do processo cervejeiro, podendo estar presentes na cerveja final, quer na sua forma livre quer na sua forma ligada (através de adutos) [29].

Os aldeídos ligados (ou *bound-state*) são muito importantes para explicar o fenómeno da cerveja envelhecida. Também conhecidos como adutos de bissulfito ou de cisteína, estes aldeídos ligados têm características não-voláteis, não conseguindo ser eliminados na fase da fervura do mosto (por evaporação) ou durante a fermentação (por reações de redução da levedura). No caso de adutos de bissulfito, o hidrogenossulfito (antioxidante produzido pela levedura) consegue formar adutos com compostos carbonílicos, o que impede que estes compostos carbonílicos sejam reduzidos ao álcool correspondente. Nos adutos de cisteína, a reação do aldeído acontece com o aminoácido cisteína, pois o grupo nucleofílico -SH da cisteína é reativo, reagindo assim com o átomo de carbono do grupo carbonilo do aldeído em questão.

A degradação destes adutos e posterior libertação dos aldeídos acontece quando fatores como o pH e temperatura de armazenamento da cerveja promovem essa quebra de ligação dos adutos [29].

5. Instrumentação

5.1. GC

A cromatografia é uma técnica analítica de amplo uso na área da química, com o intuito de separar compostos (sólidos, líquidos ou gasosos) presentes numa dada mistura. A sua aplicação é variada, desde a indústria alimentar, farmacêutica, química, ambiental, laboratórios de pesquisa, entre outros. Esta técnica é baseada na separação de componentes com base nas suas interações com uma dada fase móvel (geralmente no estado líquido ou gasoso) que flui através de uma fase estacionária (geralmente, no estado sólido ou líquido). Diferentes afinidades dos componentes à fase móvel e estacionável permitem essa separação, sendo depois detetados e quantificados. Por exemplo, uma maior afinidade do composto com a fase estacionária, faz com que o mesmo fique mais tempo retido na coluna, sendo eluído mais tarde. Vários tipos de cromatografia adequam-se a diferentes aplicações e a diferentes tipos de amostra. Dentro dos mais comuns, existem métodos de cromatografia em camada fina, cromatografia líquida de alta eficiência (geralmente conhecida por HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography*), cromatografia de troca iónica, cromatografia gasosa, entre outras.

No caso deste estudo, como se recorreu a compostos voláteis como os aldeídos, foi aplicada a cromatografia gasosa. Como o nome já indicia, esta é adequada para o estudo de compostos gasosos e voláteis, e utiliza um gás inerte como fase móvel, com uma coluna cromatográfica como fase estacionária, por onde fluirá a fase móvel.

Ora, quando uma amostra é injetada no cromatógrafo gasoso (geralmente apelidado de GC – Cromatógrafo Gasoso ou *Gas Chromatograph*), ela é vaporizada e introduzida na coluna de separação, por via de um módulo de injetor. A amostra é eluída através da coluna de separação por meio de uma fase móvel, que será um gás de arraste (inerte), pois ele "arrasta" a amostra através da coluna de separação. Os gases de arraste mais comuns são o hidrogénio, hélio ou azoto. À medida que a amostra passa pela coluna, irão ocorrer interações e trocas entre a amostra e a fase estacionária. São estas interações que ditam o tempo que esse componente demorará a ser eluído. Tendencialmente, compostos mais voláteis irão eluir primeiro, enquanto os menos voláteis permanecem mais tempo na coluna. Enquanto ocorre esta separação dos voláteis da amostra pela coluna, a coluna é regulada e mantida a uma temperatura específica programada. À medida que cada um dos componentes é

eluído, este passa por um detetor e gera um sinal que é registado em seguida sob a forma de um pico no cromatograma. Após a recolha dos sinais, o *software* acoplado ao sistema do GC processa os dados recolhidos e, com o auxílio do operador, ajuda a identificar e a quantificar os compostos voláteis. A quantificação de compostos parte do princípio que, nas mesmas condições de injeção e temperatura, e com recurso a algum modo de padrão de calibração, se possa comparar a altura e/ou a área do pico em estudo, de modo a que seja feita a sua conversão para uma concentração absoluta.

Os principais componentes de um GC incluem:

- **Injetor**

Este componente serve de porta de entrada para a introdução da amostra na coluna, através de várias etapas. O processo é iniciado com a introdução da seringa (de forma manual ou por um sistema automático de injeção) pela porta de amostragem, situada na região superior do injetor, onde se encontra o septo. A figura 9 esquematiza de forma geral o injetor do GC.

- O septo é um componente de borracha ou silicone que ajuda a selar a entrada do injetor (evitando a perda de amostra), que é perfurada pela seringa durante a injeção da amostra. Este componente minimiza também a contaminação cruzada. Este pode ser substituído com regularidade, pois é um componente consumível com tempo de vida útil [38].
- A válvula de entrada do gás de arraste (ou *inlet* de gás de arraste) é o responsável pela introdução do gás de arraste, fornecendo um fluxo constante de gás pela coluna, para que as condições de separação sejam consistentes e reproduzíveis em diferentes análises. Em sintonia com a válvula de *split*, o gás de arraste pode ajudar também a diluir a amostra, caso esta esteja muito concentrada, evitando a saturação da fase estacionária da coluna.
- A válvula de purga do septo ajuda a preservar e manter o septo em condições ideais, minimizando possíveis contaminações das amostras. Ocorre a introdução de um fluxo controlado de um gás limpo sobre o septo, antes e após a injeção. Esta limpeza elimina resíduos ou contaminantes que possam estar presentes na superfície do septo. Ajuda assim na

melhoria do sinal (evita aparecimentos de picos “fantasma” no cromatograma), assim como na reprodutibilidade do sinal.

- O forno do injetor é um componente que tem a função de aquecer a região da câmara de vaporização, onde a amostra é inserida no injetor. Através de temperaturas altas e controladas, este componente tem a função de evitar a condensação da amostra antes desta chegar à coluna, mantendo assim a volatilidade dos compostos. Para além disso, também é minimizada a contaminação através de impurezas, o que facilita a manutenção do injetor, pois evita a acumulação de resíduos indesejáveis.
- A válvula de *split* (ou *split outlet*) é o componente responsável pelo descarte do gás de arraste (juntamente com compostos da amostra). O seu controlo preciso faz com que haja uma razão ajustável entre o fluxo de gás de arraste que entra na coluna e o fluxo de gás que é descartado. Isto permite que apenas uma fração específica de amostra entre na coluna. Em certas análises em que se conhece antecipadamente que a amostra possa estar muito concentrada, é possível ajustar esta razão, evitando o risco de saturação da coluna. A regulação deste *split outlet* permite a prevenção de danos na coluna, assim como alterar a sensibilidade do sinal.
- A câmara de vaporização permite que a amostra seja misturada de forma adequada antes de seguir para a coluna. Ela evita que a condensação ocorra na coluna, mantendo a mistura na forma de vapor.
- O liner é o componente que servirá como intermediador entre a agulha e a coluna, pois irá alojar a amostra inserida, seja ela líquida ou volátil. Esta tem a função de proteger a coluna cromatográfica, assim como de reduzir a evaporação dos compostos voláteis antes que estes entrem na coluna. Com isto, após a amostra estar dentro do *liner*, há um aquecimento da região, onde se dá a vaporização da amostra [38]. Existe uma variedade de *liners* que vão ao encontro de diferentes características e materiais, de acordo com os tipos de injeções adequados.

Em injeções no modo *split*, grande parte da amostra é eliminada pela válvula de *split*, quando já se conhece *a priori* que a amostra está concentrada. Tomemos como exemplo geral uma razão de *split* de 100:1, onde o gás de arraste tem um fluxo de 104 mL/min, o fluxo da purga do septo é de 3 mL/min e o fluxo rejeitado através da válvula de *split* é de 100 mL/min. Tendo em conta a razão de 100:1, isto traduz-se em

apenas 1 mL/min de fluxo que entra para a coluna. Ou seja, de uma forma geral, apenas 1 parte da amostra segue para a coluna, enquanto 100 partes da mesma amostra são descartadas. Quanto mais alta a razão de *split*, mais baixa é a quantidade de amostra que entra na coluna. A taxa de fluxo de gás de arraste do modo *split* irá ser mais alta comparativamente ao modo *splitless*, pois só desta forma é que se consegue diminuir a concentração do analito. No modo *splitless*, a maior parte da amostra vai seguir para a coluna, minimizando a sua perda. Esta última é particularmente útil quando se pretende analisar misturas com matrizes complexas e/ou componentes com baixas concentrações. Como se pretende minimizar as perdas de amostra, a taxa de fluxo do gás de arraste deverá ser mais baixa.

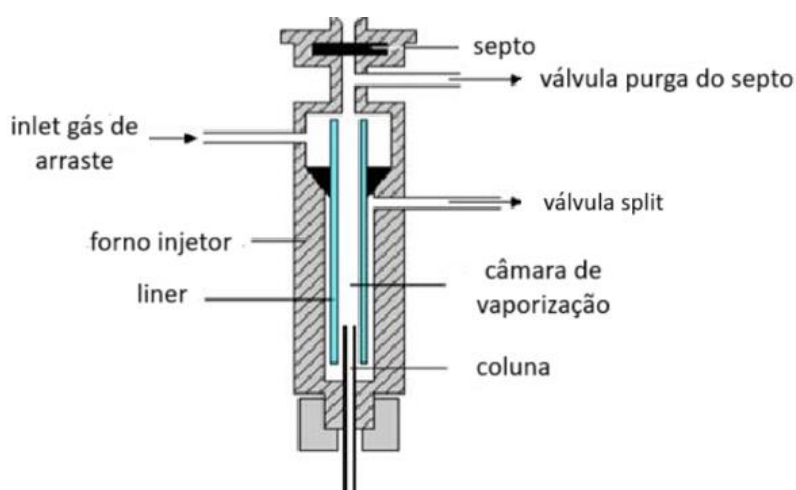


Figura 9 - Esquema geral do injetor do GC. Imagem adaptada de [36].

▪ Forno

Este é um componente essencial para uma separação eficiente e obtenção de resultados reprodutíveis. Tem a função de regular a temperatura com a máxima precisão. O ajuste do programa de temperaturas nas análises cromatográficas relaciona-se diretamente com a melhoria da separação dos compostos, pois auxiliará a coluna nas interações entre os componentes e as fases móvel e estacionária.

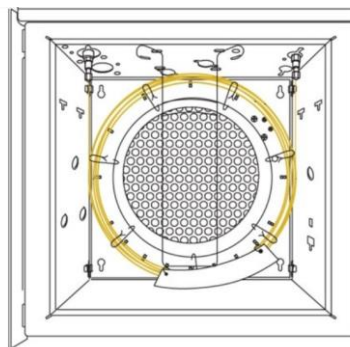


Figura 10 - Representação do forno da coluna de um GC. Imagem adaptada de [37].

▪ Coluna

Cada coluna oferece diferentes características de seletividade e resolução. Portanto, a sua escolha vai depender da natureza do composto que vai ser analisado e da aplicação em específico [39]. Os tipos de colunas usados na cromatografia gasosa são: 1) colunas de empacotamento; 2) colunas capilares.

1) Colunas de empacotamento

Apesar de serem das primeiras colunas desenvolvidas em cromatografia gasosa, já não são tão usadas quanto antigamente. Podem também ser chamadas de colunas de enchimento.

Estas são tipicamente construídas à base de vidro, alumínio ou aço inoxidável, e têm normalmente 2 a 6 metros de comprimento, com 2 a 4 milímetros de diâmetro interno. Como o nome indicia, estas contêm um suporte de partículas sólidas muito porosas (geralmente terra de diatomáceas – esqueleto de sílica), sendo a sua fase estacionária um líquido não volátil [39]. As próprias partículas sólidas podem também servir de fase estacionária (negro de carvão, sílica gel, filtros moleculares), na forma de partículas uniformes, esféricas e de pequenas dimensões. Este tipo de coluna suporta temperaturas elevadas, fluxo de gás alto e são usadas para tipos de amostra mais concentradas, sendo também mais acessíveis em termos de custos. No entanto, em comparação com as colunas capilares, estas apresentam uma menor eficiência de separação.

2) Colunas capilares

Ao contrário das colunas anteriores, estas colunas são ocas, finas e flexíveis, sendo construídas a partir de sílica fundida e revestidas exteriormente por uma camada de poliimida (que serve para proteger da humidade e conferir resistência mecânica). Estas são as mais comuns atualmente. A sílica é geralmente usada como material nas colunas capilares, pois esta é inerte (evitando adsorção indesejada de compostos), é altamente porosa (o que possibilita o aumento da área de superfície de interações com os analitos), é termicamente estável (suportando altas temperaturas utilizadas no GC, sem se deteriorar) e pode ser personalizada e revestida por outras fases estacionárias (aumentando o leque de aplicações). Estas têm um diâmetro interno entre 0,10 e 0,53 milímetros, sendo que o comprimento pode ir dos 10 aos 100 metros. Estas possuem uma maior resolução e sensibilidade em comparação com as de empacotamento. Requerem também menos volume de amostra, devido ao tamanho e espessura da coluna. Em contrapartida, saturam mais facilmente quando são utilizadas grandes quantidades de amostra. Estas colunas podem funcionar por princípios de separação por partição ou por adsorção seletiva. Ou seja, na separação por partição, os componentes da amostra com maior afinidade pela fase estacionária ficam retidos por um tempo maior, e na adsorção seletiva, a fase estacionária das colunas podem conter grupos químicos específicos para que possam interagir seletivamente com os analitos em questão.

Existem ainda três tipos de colunas capilares, sendo elas (figura 11):

- **WCOT** (*wall coated open tubular column*): Chamada de coluna capilar com parede revestida, esta tem um filme líquido de fase estacionária distribuído de forma uniforme no interior da parede da coluna. Tem regularmente uma espessura de 0,1 a 5 μm . Geralmente usadas em aplicações de compostos voláteis, hidrocarbonetos, compostos polares e apolares, etc.
- **SCOT** (*supported coated open tubular column*): Coluna capilar com fase estacionária depositada no suporte sólido. Neste caso, a fase estacionária líquida está ligada a partículas sólidas inertes (sílica fundida) que revestem a

parte interna da coluna capilar. Tratam-se de colunas com aplicações em compostos polares e voláteis.

- **PLOT** (*porous layer open tubular column*): Coluna capilar com camada porosa depositada na parede interna. A fase estacionária neste caso é constituída pelas partículas sólidas porosas que revestem a parede interna do tubo. Geralmente, interagem com a amostra através de interações por adsorção, devido à natureza dos grupos dos componentes sólidos porosos. Estas, juntamente com as SCOT, suportam uma maior quantidade de amostra (mais superfícies de contacto, mais pontos de interação). São colunas adequadas para análises de gases nobre, oxigénio e de hidrogénio.



Figura 11 – Diferentes tipos de colunas capilares. Imagem adaptada de [39].

▪ Detetor

Este componente garante a deteção e quantificação de componentes, com posterior análise da separação. Cada detetor irá utilizar diferentes propriedades para efetuar o registo da passagem do componente. Diferentes respostas do detetor estão associadas a diferentes tipos de analito e a diferentes finalidades, ou seja, o analista deve escolher o detetor que possa ser mais adequado para uma dada circunstância ou análise realizada. É feita uma conversão de sinais físicos em sinais elétricos, sendo estes registados e analisados por cromatograma. Cada detetor irá ter as suas próprias características, vantagens e limitações. Exemplos de detetores apropriados para GC são o Detetor de ionização em chama (FID – queima a amostra numa chama e mede a corrente elétrica que foi gerada pelos iões produzidos na combustão), o Detetor de captura de eletrões (ECD – com recurso a um eletrodo emissor de eletrões, cria eletrões que são capturados pelos analitos, e gera também corrente elétrica), o Detetor de espectrometria de massas (MS – fragmenta as moléculas do analito em iões e mede a intensidade e a razão massa/carga, gerando um espectro de massa único por

composto), o Detetor de infravermelho (IV – mede absorção da radiação infravermelha característica dos analitos, e produz espectros característicos dos grupos funcionais, usados depois para compará-los com padrões de espectros), entre outros [39].

- **Sistema de Gases**

Com este sistema, existe o fornecimento eficaz quer do gás de arraste quer do gás de combustão (caso o detetor acoplado ao GC seja o FID). Para resultados reprodutíveis e confiáveis, é necessário que se trabalhe com gases puros, pois estes podem afetar a deteção e a separação cromatográfica. É um sistema importante para o próprio controlo do fluxo, que exhibe importância tanto na coluna como no injetor (devido ao modo *split/splitless*).

- **Sistemas de exaustão e ventilação**

Assim que a fase móvel com os analitos passa pela coluna e pelo detetor, pode seguir por alguns caminhos. O efluente (corrente de gases e componentes da amostra) pode, na maior parte dos casos, ser descartado para a atmosfera após passar pelo detetor, desde que os compostos analisados não representem qualquer risco tanto para o meio ambiente como para o analista. Os gases eliminados serão libertados numa zona adequadamente ventilada do laboratório ou acoplada a sistemas de exaustão conectados. Em casos de potencial toxicidade, o efluente é capturado por sistemas apropriados para posterior descarte, eliminação ou tratamento. Em sistemas mais complexos, o efluente pode ser direcionado diretamente para outro detetor, em vez de ser descartado. Tem a vantagem de se obter informações complementares sobre a amostra em estudo. Com isto, o destino do efluente vai de encontro com a aplicação e com a segurança que lhe é requerida.

5.2. MS

A espetrometria de massa consegue fornecer informações valiosas em termos estruturais e de massa dos compostos em estudo. A sua alta seletividade e sensibilidade permite trabalhar em aplicações com concentrações vestigiais de amostra, pois a fragmentação iónica vai permitir um estudo melhorado e detalhado da estrutura molecular dos componentes em questão.

Existem algumas aplicações de espectrómetros de massa, dependendo a nível físico e químico da forma como os sinais são obtidos. Por exemplo, existem espectrómetros MS-TOF (*Time-of-flight*), Q-MS (Quadrupolo), IT-MS (*Ion Trap*), TQ-MS (Triplo Quadrupolo), entre outros. Cada um destes espectrómetros vai ter as suas vantagens e limitações, de acordo com a resolução de massas, velocidade de aquisição e sensibilidade. Neste trabalho, foi utilizado o MS Triplo Quadrupolo, pelo que este será o espectrómetro mencionado daqui para a frente.

A amostra, após passar pela coluna e ser separada cromatograficamente, dirige-se para o espectrómetro, sendo esta ionizada mal chegue à fonte de ionização. A partir daí, os iões vão ter uma dada massa e uma dada carga, podendo ser mencionados como m/z (*mass-to-charge ratio*, ou razão massa-carga). Após essa “produção” de iões, estes irão seguir para o analisador de massas, onde são separados por razões de m/z diferentes (de acordo com a massa que se quer selecionar e estudar). Depois de separados, passam por um detetor, onde essa informação é traduzida e seguida para o computador, após gerar espectros de massa individuais.

Com isto, abaixo estão enumerados os componentes mais importantes do Triplo Quadrupolo:

- **Fonte de ionização**

Existem várias formas e fontes para converter os compostos neutros em ionizados. Podem ser efetuados por ionização química (CI), por impacto de eletrões (EI), por eletronebulização (ESI), ionização com laser assistida por matriz (MALDI), entre outros.

Para este trabalho, a fonte de ionização a que se recorreu foi a ionização por EI.

Ora, nesta fonte de ionização são gerados eletrões de alta energia por parte de um filamento aquecido (figura 12). Este filamento gera um feixe que será perpendicular à entrada da amostra que irá em direção ao ânodo. Ao passarem por este feixe, os compostos vão colidir, sendo ionizados. A ionização acontece, pois, o feixe de eletrões é acelerado com um dado potencial (70 eV), conferindo energia suficiente para se formarem catiões radicais após o impacto dos eletrões. Esses catiões radicais, como são reativos, conseguem quebrar ligações covalentes, produzindo novamente iões secundários com menor razão m/z (figura 13). Os iões resultantes seguirão para o analisador de massa, onde serão escolhidos e analisados os respetivos m/z identificativos dos compostos em questão. Este tipo de fragmentação tem a grande vantagem de criar uma “impressão digital”, sendo altamente reprodutível, pois assim será possível identificar um composto em comparação com bibliotecas espectrais de referência. A sua aplicação e modo de funcionamento faz com que seja compatível na identificação de compostos voláteis.

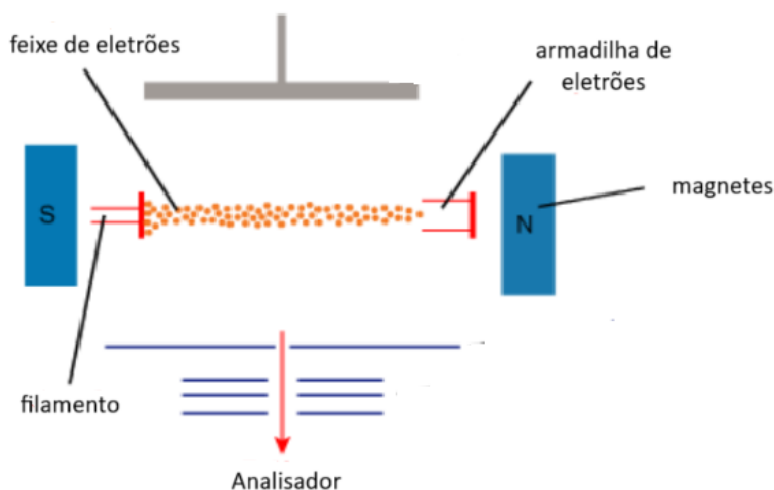


Figura 12 - Exemplo esquemático do EI. Figura adaptada de [40].

▪ Analisador de massas

A utilização de quadrupolos como analisadores de massa permitem a filtragem dos iões com base na sua relação m/z , através da criação de um campo elétrico, gerado por 4 elétrodos metálicos paralelos de forma cilíndrica, emparelhados em 2 pares opostos (figura 13A). Em cada par de elétrodos, aplica-se um potencial de corrente contínua e outra alternada, com uma dada frequência. Os 2 elétrodos mantidos com

um potencial positivo irão filtrar iões de elevada massa molecular, enquanto os elétrodos com potencial negativo filtram iões de baixa massa molecular. À medida que os iões entram no quadrupolo, as suas trajetórias serão diferentes tendo em conta a variação de potencial que for utilizada, ou seja, para um dado potencial, apenas uma certa razão m/z é filtrada, seguindo uma trajetória estável até ao fim do quadrupolo, enquanto os outros iões de m/z diferentes serão oscilados e desviados da rota, não chegando ao fim do analisador. É desta forma que a variação de potenciais do quadrupolo auxilia no varrimento da gama de iões com m/z que se pretendem analisar.

Como o nome indica, o TQ-MS tem em posse 3 quadrupolos no espectrómetro, sendo considerado então um espectrómetro de massa *tandem* no espaço. Esta é considerada uma técnica *tandem* no espaço quando a análise e seleção dos fragmentos iónicos é feita por 2 analisadores em separado (2 quadrupolos distintos, Q1 e Q3). Com isto, existe a possibilidade destes quadrupolos atuarem em modo *scanning* ou varredura (não filtra nenhum m/z em específico) ou em modo seletivo (seleção de um ou vários m/z). É importante esclarecer que o 2º quadrupolo pode funcionar em modo *scanning* (mencionado como Q2) ou atuar, geralmente, como célula de colisão (referido como q2). Os iões, previamente seleccionados no Q1, seguem para o q2, aonde encontrarão um gás de colisão (geralmente, o hélio), para que haja colisões controladas destes iões e formar assim fragmentos específicos ainda mais pequenos. A energia de colisão pode ser ajustada de acordo com a intenção do analista em querer um maior ou menor poder de fragmentação. Estes iões fragmentados passarão para o Q3, para depois haver a opção entre serem filtrados novamente (modo seletivo) ou não (modo *scanning*).

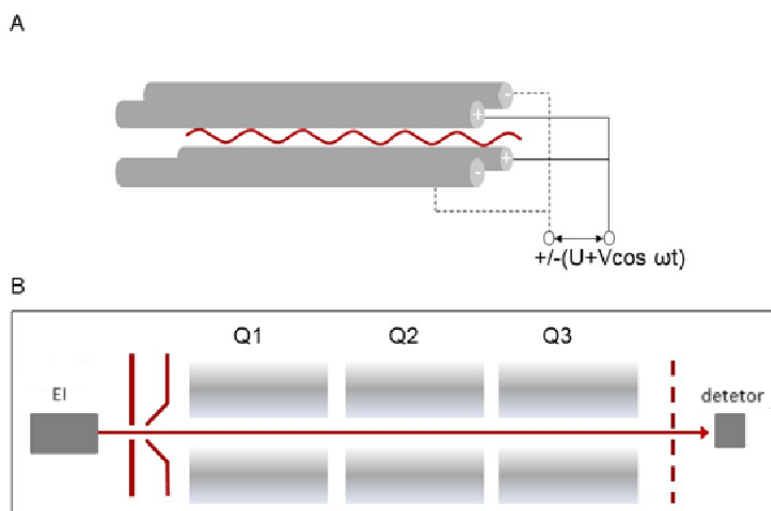


Figura 13 – Representação esquemática de um quadrupolo singular (A), e representação de um espectrómetro de massa *tandem* no espaço, com 3 quadrupolos inseridos (B). Imagem adaptada de [41].

▪ Detetor

Após a passagem e subsequente filtragem dos iões no analisador de massa, é necessário que haja uma conversão do feixe de iões para um sinal elétrico, para ser registado e analisado. Existem alguns tipos de detetores (diferem no tipo de conversão), como o *Channeltron*, *Faraday cup* ou *Daly*. Porém, o mais comum nos dias de hoje será o MCP (placa de microcanais, ou *Microchannel plate*), que é chamado também de multiplicador de multicanaís. Este é composto por uma rede de capilares de vidro alinhados numa alta voltagem, em forma de tubo, revestidos com material emissor de eletrões. Assim que o MCP é atingido pelos iões, ele liberta eletrões da superfície, por emissão secundária. Esses eletrões são depois acelerados, obtendo-se um sinal amplificado e em cascata, como se observa na figura 14. Esse sinal elétrico registado irá ser proporcional à quantidade de iões que incidiram no MCP.

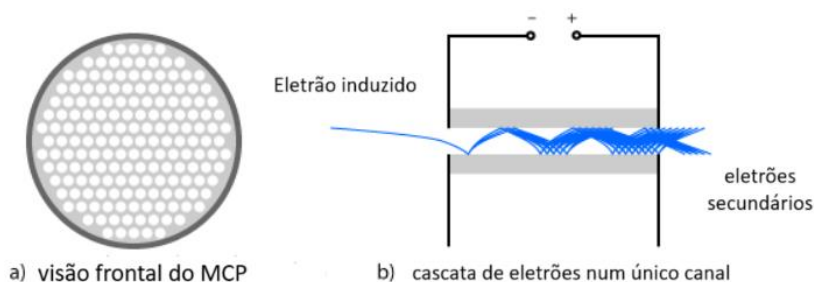


Figura 14 - Visão esquemática de um MCP. Figura adaptada de [42].

▪ Sistema de vácuo

O sistema de vácuo remove todo o ar, desde o processo onde ocorre a ionização (fonte de ionização) até à etapa da deteção dos iões. Este sistema é importante pois previne colisões entre os iões e as moléculas de ar, algo que afetaria a velocidade dos iões ao entrarem no analisador de massas ou na fonte de ionização, podendo levar a resultados com fraca precisão e repetibilidade. Ou seja, elimina interferências e possíveis contaminantes na análise.

5.3. *Headspace*-SPME

A microextração de fase sólida (SPME – *solid phase microextraction*) é uma das técnicas utilizadas para extrair compostos orgânicos voláteis em amostras líquidas/sólidas. Esta técnica é comumente associada a fenômenos de sorção/dessorção, que incluem a absorção (soluto penetra e interage com a matriz tridimensional do sólido) e adsorção (soluto interage apenas com superfície porosa do sólido) [43]. Tanto a absorção e adsorção ocorrem ao mesmo tempo, portanto é difícil distingui-las entre si experimentalmente (figura 15). Por essa razão é que se utiliza o termo sorção para mencionar este tipo de interações em simultâneo. Podem ainda existir interações por permuta iônica (se soluto for iônico, ocorre interação eletrostáticas nos locais carregados do sorvente) e por adsorção química (soluto e sorvente estabelecem ligações covalentes). Normalmente, sorvente é o termo que se utiliza quando se faz referência à fase de extração sólida. Nesta técnica, a sorção dos compostos ocorre, pois há exposição da amostra a uma camada fina de sorvente, que está fixada na superfície de um suporte. Esse sorvente pode estar fixado dentro de um tubo capilar (figura 16C), na superfície de uma barra agitadora (figura 16B) ou na superfície de uma fibra (figura 16A), sendo a última opção o caso em estudo (figura 16).

Estes sorventes são geralmente líquidos imobilizados em suportes sólidos (sílica fundida). Podem ter um ou vários componentes, com diferentes espessuras, que conferem características polares ou apolares ao sorvente. Por exemplo, existem sorventes apolares que têm na sua camada uma mistura de polímeros de siloxano, chamada de polidimetilsiloxano (PDMS), ou sorvente polares, que são compostos por poliacrilato (PA). Outros solventes podem ter misturas de vários compostos que possibilitam aplicações diferentes em diferentes tipos de compostos, como o PDMS-DVB (polidimetilsiloxano-divinilbenzeno), CW-DVB (carbowax-divinilbenzeno), DVB/carboxen-PDMS, entre outros.

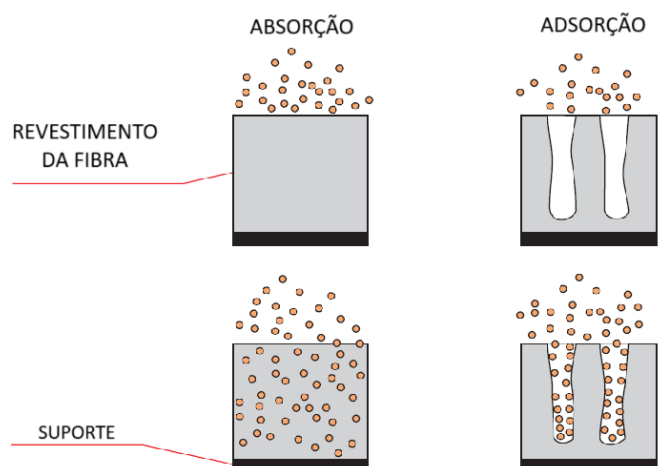


Figura 15 - Fenómenos de absorção e adsorção. Figura adaptada de [43].

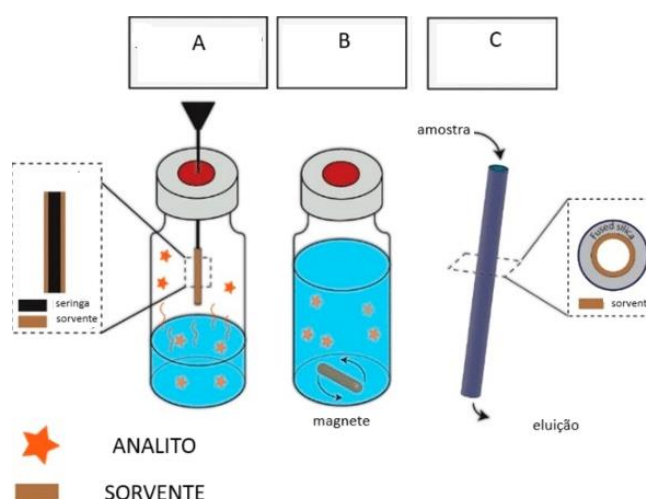


Figura 16 - (A) - sorvente fixado na superfície de uma fibra; (B) - sorvente fixado na superfície de uma barra agitadora; (C) - sorvente fixado no interior de tubo capilar. Figura adaptada de [44].

O processo que ocorre para a sorção e seguidamente dessorção em direção à coluna ocorre em poucos passos. Para o modo *Headspace*-SPME (figura 16A), a extremidade da fibra é inserida no *headspace* do vial, ficando exposta no espaço gasoso. Com o auxílio de módulos de agitação e de temperatura, os compostos voláteis presentes na fase líquida volatilizam, passando para a fase gasosa no *headspace* (figura 17A). Isto possibilita a sorção e captura dos compostos voláteis no sorvente, em condições controladas de temperatura e tempo (figura 17B). Em seguida, a fibra é novamente retraída e sai do *headspace* do vial, voltando ao estado inicial. Em seguida, é direcionada para o injetor do GC, aonde esta vai ser novamente exposta, ocorrendo o processo de dessorção térmica (volatilização do analito). A fibra é então

aquecida e os analitos sorvidos na superfície são volatilizados, o que faz com que os analitos passem do *liner* em direção à coluna, onde serão devidamente separados e quantificados (figura 17C).

Este método tem a vantagem de ser flexível e de fácil adaptação a outros métodos, de não ser necessário utilizar solventes ao preparar a amostra, de envolver extrações e mecanismos simples e de ter uma elevada capacidade de portabilidade em usos fora do laboratório [45]. Ainda assim, o método tem em contrapartida a ação do efeito de matriz, possibilidade de contaminações (seja via ar, compostos voláteis não estudados da matriz ou por dessorção incompleta) e o facto de implicar o uso de calibrações mais complexas.

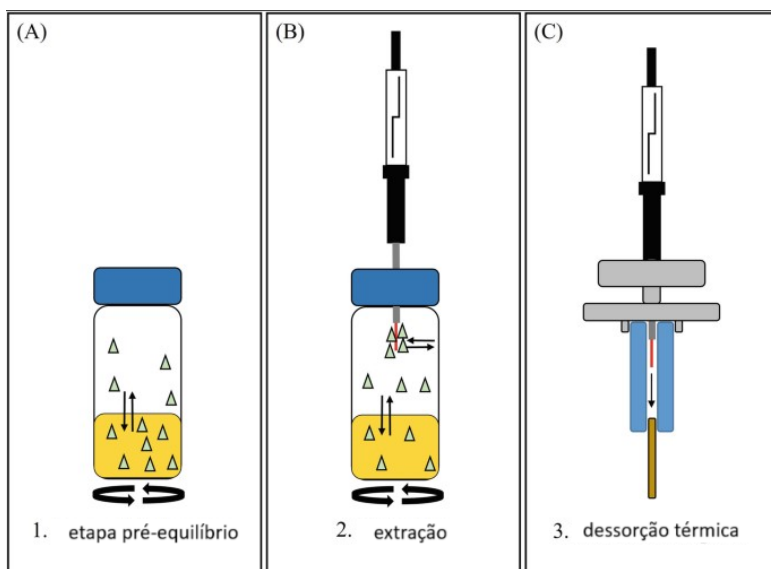


Figura 17 - (A) - Etapa de pré-equilíbrio do analito entre a fase líquida e gasosa, com auxílio de temperatura; (B) - Processo de extração, onde os analitos são sorvidos na seringa; (C) - Dessorção térmica no injetor, seguida de volatilização e passagem para a coluna; Figura adaptada de [46].

6. Implementação e validação de método analítico

Para a obtenção de resultados analíticos consistentes e com garantia de qualidade, é necessário que o método implementado esteja de acordo com parâmetros que lhes confiram confiança. Por isso, é importante que haja um controlo rigoroso dos processos em todas as etapas. Ao ter cada etapa desse processo elucidada, é possível identificar com mais facilidade possíveis causas para defeitos que possam existir. Então, é recorrente os laboratórios terem procedimentos internos de controlo de qualidade, como resposta e correção de possíveis deficiências no processo. Na prática, a validação nada mais é do que a documentação e a evidência de um conjunto de experiências laboratoriais que indicam que um dado procedimento analítico garante fiabilidade na sua finalidade. Esta validação, para além de garantir a adequação do método ao seu uso desejado, irá garantir conformidade regulatória de acordo com entidades reguladoras como a FDA (*US Food and Drug Administration*), ISO (*International Organization for Standardization*), EPA (*US Environmental Protection Agency*), entre outras. Estas definem princípios e procedimentos a atender nos métodos em validação. Para além disso, é fundamental que os resultados sejam consistentes e que estejam o mais próximo do seu valor real, ou seja, a precisão e exatidão serão pontos fulcrais. Com todo este processo descrito em aplicações de produtos espalhados por várias áreas, como no setor alimentar, farmacêutico, ambiental, energético, entre outros, transmite-se uma maior segurança no consumidor.

De acordo com a ISO 17025, alguns dos pontos essenciais para a regulação e avaliação dos métodos analíticos são a confirmação de identidade, seletividade, linearidade, limites analíticos de deteção e quantificação, precisão, exatidão e veracidade [47].

6.1. Identificação e seletividade

Para se recorrer à otimização de um método analítico, é necessário saber quais as características dos analitos em estudo e em como é que estes se diferenciam entre si. Inicialmente, com a informação presente na literatura, o analista terá a informação que servirá como base para identificar a presença de um dado analito num método.

Informações como tipo de coluna, condições experimentais, tempos de retenção dos compostos estudados e as suas massas características ajudarão a confirmar experimentalmente a sua identidade. Com isto, correlaciona-se a informação da literatura com ensaios práticos, primeiramente apenas com padrões de estudo, e seguidamente com ensaios nas amostras a aplicar. Através da confirmação com padrões de referência é que o analista conseguirá realmente determinar a identidade de cada um dos compostos [48].

Quanto à seletividade, este é um parâmetro que se aplica quando se pretende determinar a capacidade que um método analítico tem de identificar e distinguir os analitos numa dada mistura, sem que haja interferência de outros componentes presentes na mistura.

O objetivo será avaliar a eficiência da separação entre dois picos, através de parâmetros de retenção e da largura dos picos cromatográficos. Esta eficiência de separação é traduzida pela resolução R_s (equação 1), onde t_{R1} e t_{R2} serão os respetivos tempos de retenção, sendo w_1 e w_2 a largura dos picos na base (considerando serem picos gaussianos).

$$R_s = \frac{2 (t_{R2} - t_{R1})}{w_1 + w_2} \quad (1)$$

De sublinhar que quanto maior a resolução, mais os picos estarão separados com distinção. Em geral, valores de $R_s = 1$ irão corresponder a separações de picos na ordem dos 94%, enquanto valores de $R_s = 1,5$ corresponderão a uma distinção total dos picos em análise [66].

6.2. Calibração

A calibração tem um papel fulcral na validação, pois é esta que estabelece uma relação entre o sinal-resposta do instrumento e a quantidade do analito que será medido. Esta relação entre resposta e quantidade do analito irá oferecer informações acerca da linearidade da resposta, sensibilidade do método (detecção de pequenas

variações em concentrações do analito), desvios relacionados a erros sistemáticos, controlo de qualidade periódico, entre outros pontos. Existem vários modelos que modelam e preveem as relações possíveis entre uma variável dependente (geralmente designada como y , e conhecida como variável-resposta) com a variável independente (geralmente designada como x , relacionada com concentrações ou quantidades de analito em estudo). Alguns exemplos comuns utilizados são a regressão linear múltipla (aplicada em casos com mais de uma variável independente), regressão polinomial (modelação mais complexa, com relações entre variáveis não-lineares) ou a regressão linear simples. Esta última é mais simples, pois relaciona-se apenas com uma variável independente. Isto permite que a equação assuma uma relação que irá ser linear entre a variável y e a variável x .

Este modelo será o mais utilizado daqui em diante, e é assumida a sua relação na equação 2, onde m será considerado como declive da reta e b será a ordenada na origem:

$$y = mx + b \quad (2)$$

Como esta relação é apenas uma previsão de resposta, os valores certamente não serão ajustados ao modelo na sua totalidade, sendo que a diferença entre o valor obtido previsto pelo modelo e o valor obtido experimentalmente será definido como resíduo.

6.2.1. Método da Adição de padrão com padrão interno

Geralmente, são utilizados métodos externos à amostra, utilizando materiais de referência ou um conjunto de padrões, que tenham matrizes semelhantes à amostra que se pretende estudar. O mais comum destes será a curva de calibração, em que se estabelece uma relação quantitativa entre a concentração de um analito e a resposta instrumental. Por vezes, não se consegue criar uma relação entre a curva de

calibração estabelecida e o sinal de amostra que se obtém, pois poderá haver interferência da matriz da amostra no analito de interesse. A isso se nomeia efeito de matriz, onde poderão existir interferentes que suprimem ou aumentam a intensidade da resposta instrumental, levando a valores subestimados ou sobrestimados. Geralmente, para se verificar se há a ocorrência desse fenómeno, existe a possibilidade de analisar os declives das curvas de calibração externa e a curva do método de adição padrão (caso ambas sejam lineares), e, se forem significativamente diferentes, existe o efeito de matriz, tendo de recorrer a alguma matriz semelhante/mais parecida à amostra aquando da calibração externa, ou utilizar o método de adição padrão [49]. Também se consegue identificar a existência de possíveis efeitos de matriz através dos testes de recuperação, onde é feita uma adição conhecida de analito e feita em seguida a sua análise da amostra, verificando se a quantidade de analito adicionada foi a mesma quantidade de analito recuperada. Normalmente, os intervalos estabelecidos para uma “boa recuperação” sem efeitos de matriz está entre os 80% e os 120%. Se os valores analisados estiverem fora desse intervalo, pode-se inferir que existe efeito de matriz [50]. Ainda assim, estratégias como materiais de referência e métodos de referência ajudam a corroborar a informação obtida através dos testes de recuperação, assim como estimar corretamente a veracidade do método [49].

Por estas razões, o método foi efetuado com recurso ao método de adição de padrão. Este método permite uma determinação de concentrações com alta precisão de analitos em misturas complexas, tendo em conta os efeitos de matriz presentes. A adição de padrão irá ser um método interno à amostra, pois a calibração é feita adicionando quantidades conhecidas e progressivas de padrão na amostra (esquema representado na figura 21, Parte experimental, cap. 2.2. *Preparação de amostras*) [51].

Neste método, foi também utilizado como recurso o método do padrão interno, também este classificado como método interno à amostra. A presença do padrão interno faz com que seja corrigida a variabilidade experimental existente (variação de volumes injetados, diferenças na resposta do detetor, condições cromatográficas diferentes), quando este está presente na mesma concentração em todas as soluções. Este padrão interno deverá ser estável, puro e ter a mesma natureza dos analitos em estudo [52]. Portanto, como são utilizados estes dois métodos para a quantificação dos aldeídos, poderá ser mencionado como um método de adição de padrão externo com padrão interno.

Na figura 18, está representada uma esquematização geral do gráfico do método.

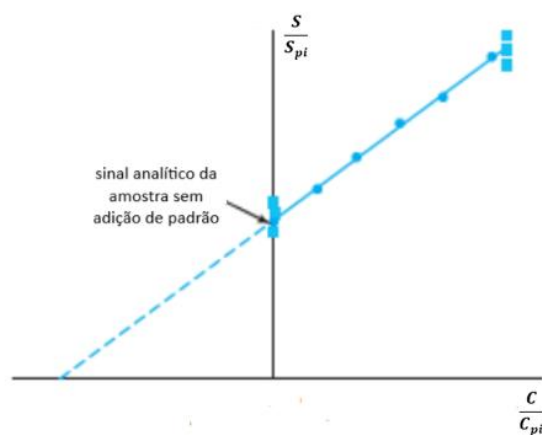


Figura 18 - Esquema geral do gráfico obtido pelo método de adição de padrão com padrão interno.

No eixo das abcissas, tem-se em conta a adição da solução-padrão em quantidades conhecidas a dividir sobre a concentração conhecida do padrão interno, enquanto no eixo das ordenadas está empregue o sinal obtido sobre o sinal obtido do padrão interno. Ou seja, com similaridades com a equação 2, a equação 3 vai ter em conta o sinal do padrão interno e a sua concentração na solução:

$$\frac{S}{S_{pi}} = m \frac{C}{C_{pi}} + b \quad (3)$$

Na equação 3, S representa o sinal que se obtém da amostra com ou sem adição do padrão, S_{pi} representa o sinal analítico obtido do padrão interno, m representa o declive, $\frac{C}{C_{pi}}$ representa a concentração da amostra a dividir sobre a concentração do padrão interno na amostra, em que, de forma geral, representará a variável x da equação, e b será a ordenada na origem. O valor de concentração será calculado através da extrapolação da reta, onde o valor de $\frac{S}{S_{pi}}$ tomará o valor de 0.

6.2.2. Linearidade

Para que a previsão do modelo seja coerente, os dados irão seguir várias respostas, podendo ser elas lineares, quadráticas, logarítmicas, entre outras. Para avaliar a linearidade de um método, existem algumas formas de o fazer e de retirar algumas conclusões [53].

Primeiramente, com uma mera **análise visual**, consegue-se notar, de grosso modo, qual a relação entre a variável dependente e independente.

Em seguida, o **coeficiente de determinação (R^2)**, apesar de ser fácil e intuitivo de se analisar, pode ser utilizado como boa prática para confirmar a linearidade, mas não como confirmação da sua existência, pois em respostas quadráticas também será possível obter valores de coeficiente de determinação próximos de 1 ou até de 1.

Outra possibilidade de se conseguir visualizar a linearidade de um método será pelos **gráficos dos resíduos**, onde se verifica a variabilidade dos resíduos e algum tipo de padronização existente no seu gráfico. Na teoria, os resíduos deverão ser aleatórios para serem aceites os pressupostos do modelo de regressão (onde o erro do modelo será independente e distribuído aleatoriamente). Se não o for, o método precisará de revisão e de, possivelmente, algum tipo de transformação de dado ou modelo para um melhor ajuste da resposta dos dados.

Também é possível verificar ajustes lineares ou polinomiais a partir do **teste de Mandel**, que é um teste estatístico que auxilia na deteção da linearidade dos resíduos. Este compara as variâncias para diferentes tipos de ajuste (grau 1 e grau 2), identificando qual o modelo que melhor se encaixa no método.

Com isto, o método só será avaliado pela sua precisão e linearidade apenas dentro de um dado intervalo de concentrações previamente selecionado e testado. Esse intervalo também poderá ser chamado de **intervalo de trabalho**, onde existe uma faixa de concentrações do analito em estudo dentro do qual o método demonstra estabilidade, precisão e exatidão na sua aplicação, assim como limites de deteção e quantificação estabelecidos. Com isto, a aplicabilidade do método e a sua finalidade encontram-se dentro desta gama. Algumas condições têm de ser cumpridas para que a curva de calibração seja construída. A curva com o intervalo estabelecido terá de ter, no mínimo, 5 pontos de calibração, com o devido espaçamento entre eles em termos de concentração [48], analisados numa ordem aleatória, para que não haja a

introdução de um viés sistemático, avaliando assim o nível de robustez que o método apresenta.

6.2.3. Homogeneidade de variâncias

O teste de homogeneidade de variâncias irá ser um passo importante para a análise da gama do método analítico, pois este verificará, através de testes estatísticos, se a variação apresentada nos resultados é aleatória e consistente em toda a gama de concentração. Este teste determina a precisão das medições no ponto mais baixo e mais alto de concentração, a fim de se verificar se a variação que ocorre é homogênea ou não. Se os testes estatísticos demonstrarem que a variação não é homogênea (ou seja, é heterogênea), isto indica a possibilidade de haver algum tipo de variação não-aleatória presente no método, podendo levar a adequações do modelo e a transformações de variáveis, para permitir um encaixe melhor. Para diferentes modelos, são recomendadas diferentes normas ISO. Para modelos lineares, aplica-se a norma ISO 8466-1, enquanto modelos quadráticos estão enquadrados na ISO 8466-2.

Ora, para o teste de homogeneidade de variâncias é recomendada a medição de sinal de 10 soluções padrão em cada limite de concentração. Ou seja, é necessário proceder a análise dos sinais na concentração máxima e mínima do intervalo de trabalho, estudando a variância tanto no ponto mínimo como máximo. Esse estudo de variâncias irá permitir saber se existirão diferenças significativas entre a concentração mínima e máxima [54]. As respetivas variâncias dos sinais analíticos são obtidas através das equações 4 e 5:

$$s_m^2 = \frac{\sum_i^{n_m} (y_{mi} - \bar{y}_m)^2}{n_m - 1} \quad (4)$$

$$s_M^2 = \frac{\sum_i^{n_M} (y_{Mi} - \bar{y}_M)^2}{n_M - 1} \quad (5)$$

Após a obtenção das variâncias nas extremidades do intervalo de trabalho, submetem-se as variâncias a um teste de variância (teste-F), averiguando-se se há

algum tipo de diferença significativa entre a concentração mínima e máxima escolhida para o método. O cálculo do valor de teste F_{exp} está descrito nas equações 6 e 7.

$$F_{\text{exp}} = \frac{s_M^2}{s_m^2} \quad \text{quando } s_M^2 > s_m^2 \quad (6)$$

$$F_{\text{exp}} = \frac{s_m^2}{s_M^2} \quad \text{quando } s_m^2 > s_M^2 \quad (7)$$

Posteriormente, comparam-se os valores experimentais obtidos de F_{exp} com o valor tabelado da distribuição F, para $n-1$ graus de liberdade, para um nível de confiança de 99%. Com isto, se $F_{\text{exp}} \leq F_{\text{tab}}(g_{\text{Im}}; g_{\text{IM}}; 99\%)$, então a diferença entre variâncias não será significativa, podendo prosseguir o método com um intervalo de trabalho ajustado. Já se $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}(g_{\text{Im}}; g_{\text{IM}}; 99\%)$, a diferença entre variâncias será significativa, o que poderá indiciar a possibilidade de reduzir o intervalo de concentrações (até que não haja diferença entre variâncias) ou efetuam-se correções à curva de calibração, com a adição de pesos nos pontos para se proceder à calibração [54].

6.3. Limites analíticos

Os limites analíticos são importantes para definir intervalos de trabalho do método, bem como oferecer informações acerca da sensibilidade do método, ao nível da detecção e quantificação dos analitos em análise.

Ora, a menor concentração de analito possível de ser detetada (mas não quantificada) será chamada de limite de detecção (LOD). Já a menor concentração de analito passível de ser quantificada com um certo grau de confiança será definida como limite de quantificação (LOQ). Existem algumas formas e métodos diferentes a fim de estimar tanto o LOD como o LOQ. Primeiramente, esta poderá ser feita através de **análise visual**, que se baseia no ensaio de amostras de concentrações baixas de analito, cabendo ao analista estabelecer e decidir se as diferenças de sinal entre a amostra que foi analisada e a linha de base são significativas ou não [55]. Geralmente,

este procedimento é mais utilizado em métodos de análise não instrumental, devido ao seu grau de subjetividade inerente ao analista.

Um procedimento mais comum será através do **desvio padrão do ensaio do branco**, onde são medidas várias réplicas de amostras de branco (recomendadas 10 ou mais réplicas), isto é, na ausência do analito de estudo [56]. Tanto o LOD como o LOQ são calculados através das equações 8 e 9, aonde X_{branco} representa a concentração média obtida no branco, e s_{branco} representa o desvio padrão do branco.

Este procedimento tem a desvantagem de não ter em conta a incerteza relativa à reta de concentração.

$$LOD = X_{branco} + 3 * s_{branco} \quad (8)$$

$$LOQ = X_{branco} + 10 * s_{branco} \quad (9)$$

É possível também determinar os limites analíticos a partir da **reta de calibração**, onde se utiliza o declive m , bem como o desvio padrão da ordenada na origem S_{ord} ou o desvio padrão associado aos resíduos da reta de regressão Sy/x . As expressões estão representadas na equação 10 e 11 [56]. Este procedimento tem a desvantagem de poder conduzir a valores de LOD e LOQ sobrestimados, bem como de necessitar que a curva de calibração seja do tipo linear.

$$LOD = \frac{3}{m} * Sy/x \quad \text{ou} \quad LOD = \frac{3}{m} * S_{ord} \quad (10)$$

$$LOQ = \frac{10}{m} * Sy/x \quad \text{ou} \quad LOQ = \frac{10}{m} * S_{ord} \quad (11)$$

Por último, é possível utilizar o procedimento através da razão sinal/ruído. Neste caso, é analisado o ruído nos arredores do pico do analito, podendo-se estimar uma concentração que seja equivalente ao LOD e LOQ. Este procedimento só se aplica nos casos em que o método apresente uma linha de base com ruído [57]. Deste modo, estima-se o LOD como $S/N = 3$ e o LOQ como $S/N = 10$. A sigla S/N , representa, em inglês, *Signal/Noise*. Na figura abaixo (figura 19), está esquematizado um exemplo encontrado de um cromatograma que apresenta um pico analítico e o ruído em redor. O sinal do pico é observado através da amplitude do sinal, e o ruído é medido em torno do pico de interesse, estimando-se o seu desvio padrão. O desvio padrão do ruído estima o nível de flutuação aleatória que acontece aquando da medição do sinal. Então, obtém-se maiores sinais S/N quanto mais baixo for o desvio padrão do ruído. Com estas informações, é possível estimar tanto o LOD como o LOQ.

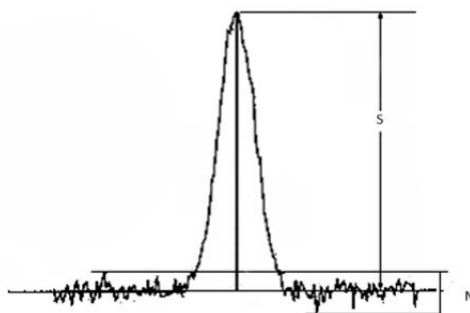


Figura 19 - Cromatograma geral, com sinal (S) e ruído (N) assinalados. Figura adaptada de [58].

6.4. Precisão

A precisão irá avaliar a dispersão de medições replicadas que ocorre entre ensaios independentes e repetidos para a mesma amostra ou padrão, em condições experimentais definidas. As amostras ou padrões utilizados não precisam necessariamente de ser de referência. Este parâmetro da precisão relaciona-se com o erro aleatório do sistema de medição sendo importante para a contribuição da incerteza da medição. As réplicas deverão ser independentes, ou seja, todo o processo e preparação de amostra deverão ser repetidos [56]. A precisão é tendencialmente avaliada ou pelo desvio padrão, variância, ou então pelo desvio padrão relativo (RSD).

O desvio padrão relativo (RSD) é avaliado pela equação 12, em que s representa o desvio padrão, e $\bar{x}$ representa a média das réplicas medidas.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\% \quad (12)$$

Mais ainda, existem duas medidas extremas avaliadas para a precisão, designadas por repetibilidade e reprodutibilidade. Existe ainda outro nível importante, chamado de precisão intermédia (ou variabilidade intralaboratorial), que será mencionado em seguida. É importante referir que a precisão irá variar com o intervalo de concentrações escolhido [56].

6.4.1. Repetibilidade

A repetibilidade será o nível que originará tendencialmente valores de desvios padrão mais baixos, pois as suas réplicas de medições serão efetuadas em condições idênticas num espaço de intervalo de tempo curto, apenas por um analista, no mesmo equipamento e laboratório, e sem alterar os reagentes [56]. Este tipo de dispersão irá oferecer informação principalmente acerca da variabilidade inerente à preparação da amostra.

Normalmente, é necessário efetuarem-se 10 ou mais medições sobre a mesma amostra ou padrão ($n \geq 10$), em condições de repetibilidade. Este procedimento pode ser utilizado em toda a gama de trabalho do método, caso seja necessário.

Ora, o limite de repetibilidade Δr (equação 13) representa a maior diferença absoluta possível entre duas medições, em condições de repetibilidade. Esta calcula-se através da equação 13:

$$\Delta r = t_{\alpha, (n-1)} \times \sqrt{2} \times s_r \quad (13)$$

Na equação 13, o parâmetro $t_{\alpha, (n-1)}$ será o valor da distribuição *t-Student* para um dado nível de significância α e com $(n-1)$ graus de liberdade, enquanto s_r será o desvio padrão da repetibilidade [56].

6.4.2. Precisão intermédia

Na variabilidade intralaboratorial, ou precisão intermédia, a avaliação da dispersão é feita da mesma forma que a repetibilidade, só que é definida a condição que varia ao longo do tempo. Por outras palavras, condições como diferentes analistas, equipamentos, reagentes ou calibrações poderão ser fatores que permitem a introdução de variações nos resultados [56]. Portanto, a precisão intermédia irá abranger mais fatores de variação que a repetibilidade, o que leva a um provável aumento de dispersão.

Para que se satisfaça a condição de não se executar ensaios em condições de repetibilidade, basta as medições serem feitas em dias diferentes. É recomendado também que o número total de ensaios seja igual ou superior a 15, ou seja, $n \geq 15$. Devido à natureza volátil dos analitos de estudo e pela própria complexidade da matriz, a precisão intermédia pode ser obtida através de amostras com composições semelhantes. Com isto, o procedimento irá basear-se na seleção de um conjunto de t amostras, em que são realizados n ensaios. Quando o número de ensaios n é

constante em todas as séries de ensaios t , o desvio padrão da precisão intermédia s_I será dado pela equação 14.

$$s_I = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^t \sum_{k=1}^n (y_{jk} - \bar{y}_j)^2}{t(n-1)}} \quad (14)$$

Na equação 14, o termo y_{jk} representa o valor experimental e $\bar{y}_j$ representa o valor médio obtido de cada conjunto de ensaios.

6.4.3. Reprodutibilidade

Este parâmetro é o que oferece uma maior variabilidade nas medições, pois o método será testado a diferentes níveis. Condições como diferentes laboratórios, operadores, equipamentos e condições ambientais diferentes poderão causar um impacto maior na variabilidade da amostra [56].

Com isto, este nível de precisão ajuda a determinar a avaliação da robustez do método e a validação dos resultados através de ensaios interlaboratoriais.

Laboratórios independentes são selecionados para efetuar os ensaios, e requerem o mesmo tipo de equipamento para efetuar a medição. Protocolos detalhados, com informações desde preparação de amostras e na obtenção de resultados, são importantes para que se siga detalhadamente o mesmo procedimento na execução do método. Depois do analista recolher os resultados e analisá-los, cabe a este utilizar testes estatísticos que avaliem a reprodutibilidade dos resultados. Caso os resultados apresentem diferenças ou problemas significativos, requer que sejam identificadas as possíveis causas para tal, e em seguida aplicadas ações corretivas tendo em vista a melhoria do método.

6.5. Veracidade

A veracidade é descrita como a medida de proximidade entre resultados de medições obtidas através do método a implementar com um valor de referência ou valor considerado verdadeiro do analito estudado. É analisada a capacidade que o método tem de fornecer medições exatas e precisas. Esta relaciona-se diretamente com o erro sistemático, pois se o método apresentar erros sistemáticos significativos, as medições do método também se distanciarão sistematicamente do valor verdadeiro. Para a avaliação da veracidade, existem algumas estratégias. Por exemplo, a medição de um analito a partir de amostras fortificadas fornece informação acerca da percentagem de recuperação desse mesmo analito. A quantidade adicionada conhecida do analito na matriz da amostra, na teoria, terá de ser recuperada após a análise dentro de certos intervalos de concentração aceitáveis (geralmente entre 80% e 120%) para que se considere que haja uma “boa recuperação” do analito. Outra estratégia será a medição de um material de referência, comparando depois o resultado com o seu valor certificado. Ou então, em vez de um material de referência, também é possível analisar a amostra através de um método de referência, e comparar posteriormente os resultados através do método a ser implementado [49].

7. Enquadramento

O teor dos aldeídos na cerveja e nas suas diferentes matrizes é um fator determinante que afeta o consumidor final, sendo consequentemente objeto de estudo pelas cervejeiras. A sua compreensão é essencial para que a monitorização durante todo o processo seja regulada, com vista a garantir a qualidade e a consistência do produto.

Isto permite um estudo quer quanto à estabilidade da cerveja (degradação ao longo dos tempos) quer no impacto que possa existir no gosto e aroma, para que a

cerveja mantenha um perfil de sabor característico e desejado, sem causar embaraço ou efeito indesejável para quem a consome.

Com isto, a implementação e validação de um método que determine o teor desta família de compostos voláteis será importante para que se estude e se profile com consistência e qualidade a sua presença em produtos acabados, podendo posteriormente aplicar-se a diferentes produtos ou até mesmo a outras matrizes do processo (mosto e cerveja em fermentação).

Parte experimental

1. Materiais e métodos

1.1. Reagentes

- Água ultrapura (0,055 $\mu\text{S}/\text{cm}$; 18,2 $\text{M}\Omega \times \text{cm}$; *ThermoScientific Smart2Pure*);
- Metanol ($\geq 99,9\%$, CAS 67-56-1, *Merck*);
- Isobutiraldeído ($\geq 99,0\%$, CAS 78-84-2, *Fluka*);
- 2-metilbutanal ($\geq 99,0\%$, CAS 96-17-3, *Sigma-Aldrich*);
- Pentanal ($\geq 97,0\%$, CAS 110-62-3, *Fluka*);
- Hexanal ($\geq 97,0\%$, CAS 66-25-1, *Fluka*);
- β -Damascenona ($\geq 99,0\%$, CAS 23696-85-7, *Sigma-Aldrich*);
- Nonanal (95,0%, CAS 124-19-6, *Aldrich*);
- Furfural ($\geq 99,0\%$, CAS 98-01-1, *Fluka*);
- (*E*)-2-octenal (94,0%, CAS 2548-87-0, *Aldrich*);
- Metional (97,0%, CAS 3268-49-3, *ThermoScientific*);
- (*E*)-2-nonenal (97,0%, CAS 18829-56-6, *Aldrich*);
- Benzaldeído (99,0%, CAS 100-52-7, *Aldrich*);
- (*E,E*)-2,4-nonadienal (96,0%, CAS 5910-87-2, *Aldrich*);
- PFBHA ($\geq 99,0\%$, CAS 57981-02-9, *Sigma-Aldrich*);
- p-fluorobenzaldeído ($\geq 98,0\%$, CAS 459-57-4, *Sigma-Aldrich*);
- Hélio ($\geq 99,99\%$, CAS 7440-59-7, *Air Liquide*);

1.2. Materiais

- Balões volumétricos de 10,00, 25,00, 50,00, 100,00 e 200,00 mL;
- Balança analítica, 0,1 mg resolução (*Mettler Toledo*);
- Espátulas;
- Recipientes de vidro borossilicato transparente com tampa de rosca para armazenamento de 10 mL;
- Banho de ultrassons (*J.P. Selecta*);
- Pipetas volumétricas de 5,000, 10,00, 15,00, 20,00 e 25,00 mL;
- Pipeta automática de 200,0 e 1000 µl (*Eppendorf Xplorer*);

1.3. HS-SPME-GC-MS

- GC: *Trace 1300 (Thermo Scientific)*;
- MS: *TSQ9000 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (Thermo Scientific)*;
- Módulo *Autosampler*: *TriPlus RSH (Thermo Scientific)*;
- Coluna cromatográfica: Fase polietileno-glicol 0,25 µm (60m x 0.25mm) – *TR-Wax (Thermo Scientific)*;
- Fibra SPME DVB/PDMS: *Thermo Scientific SMART SPME Fibers for Triplus RSH SMART Autosamplers*;

1.4. Condições Experimentais

➤ Módulo Autosampler

- Tempo de incubação: 7 minutos;
- Temperatura de incubação: 45 °C;
- Tempo de extração: 20 minutos;
- Agitador *on*: 10 segundos;
- Agitador *off*: 2 segundos;

➤ Injetor

- Modo: *Splitless*
- Tempo em *Splitless*: 30 segundos
- Tempo dessorção: 5 minutos e 30 segundos
- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Fluxo gás de arraste (Hélio): 1.400 mL/min;
- Fluxo em *Split*: 70,0 mL/min
- Fluxo da purga do septo: 5.000 mL/min

➤ Coluna

- Rampa de aquecimento (figura 20):
 - ❖ 40 °C por 1 minuto;
 - ❖ 40 °C aos 250 °C, numa taxa de aquecimento de 10 °C/min;
 - ❖ 250 °C por 13 minutos;
 - ❖ Tempo total de corrida: 35 minutos

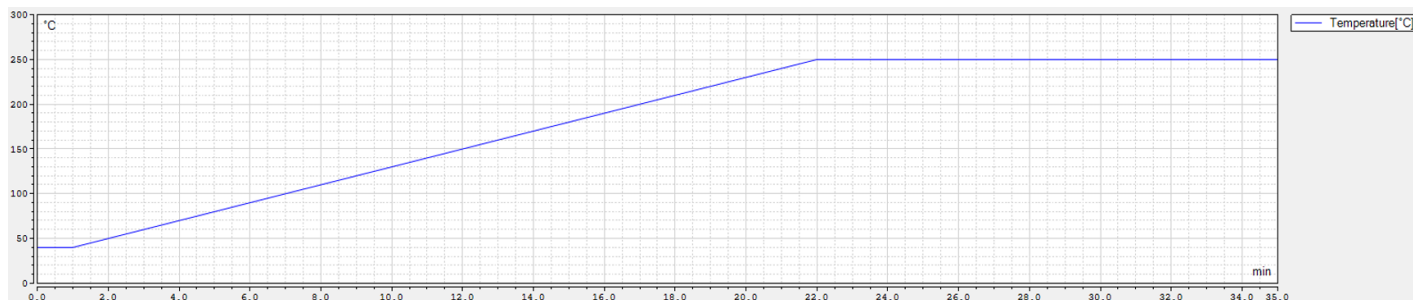


Figura 20 - Rampa de aquecimento utilizada no método.

➤ Detetor

- Modo fonte de ionização: EI;
- Temperatura da fonte de ionização: 250 °C;
- Temperatura da linha de transferência MS: 250 °C;
- Tipo de Scan: SIM (*Selected Ion Monitoring*) (tabela 3).

Tabela 3 - Tabela-método, com respetivos tempos de retenção, janelas de análise e massas características de cada composto

Composto	Tempo retenção (min)	Janela de retenção (min)	m/z
isobutiraldeído	13,45	0,8	195; 250
2-metilbutanal	14,35	0,4	239; 253
pentanal	15,40	1,0	207; 239
hexanal	16,50	0,3	239
β -damascenona	17,65	0,3	121
nonanal	19,55	0,3	239
furfural	20,10	0,8	291
(E)-2-octenal	20,18	0,4	250
metional	20,69	0,3	61
(E)-2-nonenal	21,10	0,3	155; 250
benzaldeído	21,96	0,3	271; 301
p-fluorobenzaldeído	22,00	0,4	289; 319
(E,E)-2,4-nonadienal	22,60	0,8	276

2. Procedimento

2.1. Preparação de soluções *stock*

Em recipientes de vidro para armazenamento de 10 mL, prepararam-se as soluções-mãe individuais dos compostos voláteis, reagente derivatizante (PFBHA) e padrão interno (p-fluorobenzaldeído) com as concentrações determinadas na tabela 4, tendo em consideração o grau de pureza de cada um deles. É importante ressaltar que isobutiraldeído, 2-metilbutanal e pentanal foram preparados em água ultrapura, enquanto os restantes compostos carbonílicos foram preparados em metanol 99,9%, derivado da sua fraca solubilidade em água, à medida que a sua cadeia de carbonos aumenta.

Tabela 4 - Valores de concentração molar das soluções-mãe dos compostos em estudo

Compostos	Concentração molar (mol/L)
β-damascenona	$5,3 \times 10^{-2}$
2-metilbutanal	$1,1 \times 10^{-1}$
furfural	$1,0 \times 10^{-1}$
(E)-2-Nonenal	$7,1 \times 10^{-2}$
benzaldeído	$9,3 \times 10^{-2}$
metional	$9,3 \times 10^{-2}$
hexanal	$9,7 \times 10^{-2}$
isobutiraldeído	$1,4 \times 10^{-2}$
p-fluorobenzaldeído	$7,9 \times 10^{-2}$
pentanal	$1,1 \times 10^{-1}$
nonanal	$6,7 \times 10^{-2}$
PFBHA	$4,7 \times 10^{-2}$
(E)-2-octenal	$7,4 \times 10^{-3}$
(E,E)-2,4-nonadienal	$6,2 \times 10^{-3}$

A partir das concentrações das soluções-mãe individuais dos compostos carbonílicos, efetuou-se uma etapa de diluição intermediária dos aldeídos através de uma mistura de compostos, separados em 2 balões de 50,00 mL. Esta separação dos aldeídos em dois balões tem a ver com o facto de se ter efetuado intervalos de concentrações com teores de aldeídos mais concentrados no balão 2. O conteúdo dos balões, assim como as concentrações dos compostos (em 50,00 mL) estão descritos na tabela 5. É necessário ter em conta a escala de concentrações que foram empregues (mg/mL na tabela 4, e mg/L na tabela 5).

Tabela 5 - Composição e concentração molar dos aldeídos nos balões 1 e 2, ambos de 50,00 mL

Balão 1	M (mol/L)	Balão 2	M (mol/L)
nonanal	$2,8 \times 10^{-5}$	isobutiraldeído	$4,3 \times 10^{-5}$
pentanal	$2,3 \times 10^{-5}$	2-metilbutanal	$3,7 \times 10^{-5}$
hexanal	$1,0 \times 10^{-5}$	β -damascenona	$4,2 \times 10^{-5}$
(E)-2-nonenal	$5,7 \times 10^{-6}$	furfural	$1,0 \times 10^{-4}$
benzaldeído	$2,8 \times 10^{-5}$	metional	$2,9 \times 10^{-5}$
(E)-2-octenal	$2,4 \times 10^{-6}$		
(E,E)-2,4-nonadienal	$1,4 \times 10^{-5}$		

Desta vez, para um balão de 100,00 mL, efetuou-se mais uma etapa intermediária de diluição, pipetando-se 50 μL do balão 1 e 1000 μL do balão 2, perfazendo o resto do balão com água ultrapura. As concentrações dos aldeídos dentro do balão de 100,00 mL estão discriminadas na tabela 6.

Tabela 6 - Concentração molar da mistura de aldeídos num balão de 100,00 mL

Balão 100,00 mL	M (mol/L)
nonanal	$1,4 \times 10^{-8}$
pentanal	$1,2 \times 10^{-8}$
hexanal	$5,0 \times 10^{-9}$
(E)-2-nonenal	$2,9 \times 10^{-9}$
benzaldeído	$1,4 \times 10^{-8}$
(E)-2-octenal	$1,2 \times 10^{-9}$
(E,E)-2,4-nonadienal	$7,2 \times 10^{-9}$
isobutiraldeído	$4,3 \times 10^{-7}$
2-metilbutanal	$3,7 \times 10^{-7}$
β -damascenona	$4,2 \times 10^{-7}$
furfural	$1,0 \times 10^{-6}$
metional	$2,9 \times 10^{-7}$

É a partir das soluções deste balão de 100,00 mL que se utilizaram os padrões e diluições finais para os balões do método de adição padrão. Foram então pipetados 5,000 mL, 10,00 mL, 15,00 mL e 20,00 mL para os balões de 50,00 mL destinados à calibração por via do método de adição padrão. As gamas de concentrações dos aldeídos adicionados nos diferentes balões do método adição padrão (da figura 21) estão descritas na tabela 8 (*cap. Resultados e Discussão – 1.2.1*).

Quanto à preparação do reagente derivatizante, O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)hidroxilamina, pesaram-se 100,0 mg num balão volumétrico de 10,00 mL, para que a sua concentração fosse de 10 mg/mL. Quanto ao padrão interno p-fluorobenzaldeído, preparou-se uma solução (para um balão de 25,00 mL) de 10 mg/L.

2.2. Preparação de amostras

As amostras foram arrefecidas na câmara de refrigeração a 4 °C, por pelo menos 30 minutos. Em seguida, efetuou-se a descarbonatação da amostra no banho de ultrassons, por cerca de 5 minutos [62]. É importante ter em conta que serão necessários, no mínimo, 125 mL de amostra para efetuar a calibração.

Depois da amostra estar descarbonatada, foram preparados 5 balões de 50,00 mL, e efetuaram-se as novas soluções de acordo com a configuração representada na figura 21. A solução utilizada do padrão na figura 21 foi a mistura composta por todos os aldeídos no mesmo balão de 100,00 mL, com a concentração descrita anteriormente na tabela 6. Cada balão (exceto o balão 0 que não contém nenhum volume de padrão adicionado) irá ter a concentração adicionada de aldeídos representada na tabela 8.

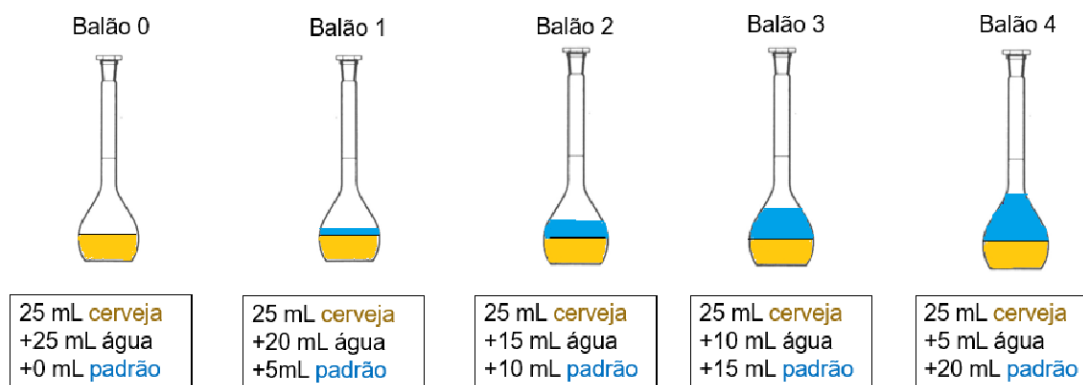
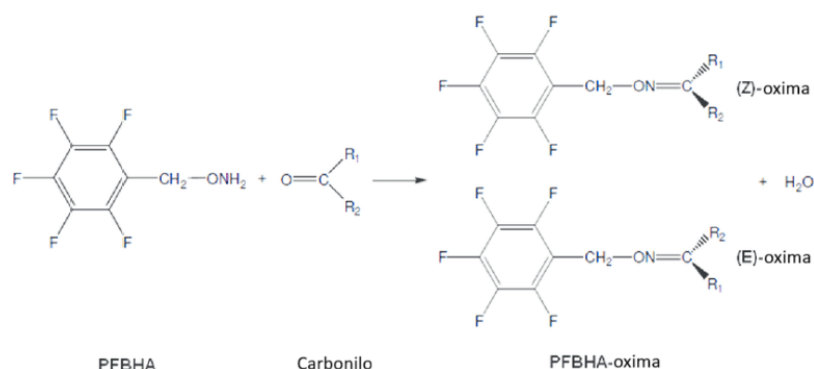


Figura 21 - Configuração dos balões (50,00 mL) para o método de adição padrão.

Após estes balões estarem preparados e acertados até ao menisco, pipetam-se 5,000 mL de cada balão para os respetivos *vials* de injeção. Finalmente, são pipetados cerca de 50,0 µL da solução do padrão interno (p-fluorobenzaldeído) e 350 µL do reagente derivatizante (PFBHA) para cada um dos 5 *vials*.

A utilização do PFBHA tem o intuito de aumentar a volatilidade dos compostos voláteis, melhorar a estabilidade química dos analitos e também torná-los mais seletivos para o método em questão. Em baixo, segue o mecanismo geral que ocorre entre o PFBHA e um composto carbonílico geral.



Nesta situação, o grupo funcional do reagente derivatizante reage com o grupo carbonilo do aldeído, dando origem a compostos mais facilmente volatilizáveis. É possível que ocorra rearranjos estruturais na estrutura do novo composto, o que leva ao aparecimento de isómeros *Z* e *E* nas oximas resultantes. Apesar das estruturas diferentes, as oximas contêm a mesma massa molecular. Para proceder à quantificação dos aldeídos, é necessário recorrer à soma das áreas dos picos cromatográficos dos isómeros, caso existam [67]. A isomerização do aldeído derivado do PFBHA ocorre em casos como isobutiraldeído, pentanal, hexanal, nonanal, furfural, (*E*)-2-nonenal e (*E,E*)-2,4-nonadienal. Estes aldeídos descritos anteriormente são apresentados no Anexo 1.

Resultados e discussão

1. Implementação e validação do método analítico

1.1. Identificação e seletividade

O método proposto neste trabalho foi efetuado com o espectrómetro de massa programado em modo SIM. Por outras palavras, dos três quadropolos presentes no detetor, apenas o Q1 estará a funcionar no modo seletivo, pelo que este filtrará os analitos de acordo com o m/z e janelas de retenção pré-selecionados. O espectrómetro irá medir a intensidade do sinal dos m/z selecionados, sendo útil para a sua identificação e quantificação. Já o Q2 e Q3 estarão a funcionar em modo *scanning*, o que significa que ambos os quadropolos estão configurados para varrer todo o espectro de massas que advém do quadropolo que lhes antecedeu. Isto significa que em ambos não haverá nem reações de colisão com fragmentação nem seleção de novos m/z .

A escolha dos iões caraterísticos de cada composto é feita inicialmente através de uma análise interpretativa dos espectros individuais dos compostos examinados em modo *scanning* total (com todos os quadropolos a funcionar em modo *scanning*), pois deste modo consegue-se varrer e analisar uma ampla faixa de massas, em que mostra a distribuição total de iões m/z de cada composto. Aliado a isso, os dados obtidos na literatura ajudam a caraterizar os compostos de acordo com um ou vários m/z selecionados. As caraterísticas em termos de m/z e tempos de retenção já foram determinadas na tabela 3 (*cap. 1.4 - Condições experimentais*).

Ora, esta filtragem de analitos de acordo com m/z e tempo de retenção facilita e aumenta a seletividade do método, dado que permite uma boa resolução entre picos sem que eles se sobreponham no cromatograma.

Ainda assim, existem aldeídos que partilham do mesmo ião caraterístico utilizado para a sua caracterização e quantificação. Nos casos de pares como isobutiraldeído com (*E*)-2-nonenal ($m/z = 250$), isobutiraldeído com (*E*)-2-octenal ($m/z = 250$), ou hexanal com nonanal ($m/z = 239$), mesmo que os pares partilhem a mesma massa caraterística, os picos estarão afastados o suficiente para que a resolução não seja

comprometida. Já entre pares como o pentanal com hexanal ou (*E*)-2-octenal com (*E*)-2-nonenal, ambos partilham de m/z comuns (239 e 250, respetivamente) e estão mais próximos uns dos outros (cromatograma dos aldeídos no Anexo 1).

Tendo em conta as informações retiradas dos cromatogramas em relação a tempos de retenção e à largura do pico, obtém-se a tabela 7 (em que t_R corresponde ao tempo de retenção, W à largura do pico e R_s à resolução):

Tabela 7 - Parâmetros utilizados para a determinação da resolução

	pentanal	hexanal	(<i>E</i>)-2-octenal	(<i>E</i>)-2-nonenal
t_R	15,52	16,45	20,20	21,15
W	0,05	0,08	0,05	0,11
R_s	14,3		11,9	

Através do cálculo da resolução para os dois pares, os valores obtidos de R_s são de $R_s=14,3$ e $R_s=11,9$ para os pares pentanal/hexanal e (*E*)-2-octenal/(*E*)-2-nonenal, respetivamente. Isto indica que existe uma separação eficiente, com distinção do total dos picos, pois $R_s \geq 1,5$.

Portanto, conclui-se que neste método, a identificação e a seletividade dos aldeídos não serão um entrave na validação.

1.2. Calibração

1.2.1. Gama de concentrações

O método de adição padrão com padrão interno foi o tipo de calibração eleito para este trabalho. Como explicitado anteriormente, será um método que conseguirá corrigir qualquer tipo de viés sistemático apresentado em resultados, assim como efetuar a correção do efeito da matriz, que por si só é um aspeto muito importante na avaliação da precisão.

Quanto à gama de concentrações utilizada para os aldeídos, estas são mencionadas mais abaixo, na tabela 8. Considera-se o primeiro ponto da reta aquele em que não haverá qualquer adição do padrão na amostra, ou seja, aquele que só contará com a amostra e água ultrapura (balão 0).

Tabela 8 - Gama de concentrações estabelecidas para os balões 1, 2, 3 e 4 através da adição padrão (5, 10, 15 e 20 mL adicionados, respetivamente)

Intervalo de concentrações (em µg/L)				
Balão	isobutiraldeído	2-metilbutanal	pentanal	hexanal
1	3,1	3,2	0,1	0,05
2	6,2	6,4	0,2	0,1
3	9,3	9,6	0,3	0,15
4	12,4	12,8	0,4	0,2
	β-damascenona	nonanal	furfural	(E)-2-octenal
1	8	0,2	10	0,015
2	16	0,4	20	0,03
3	24	0,6	30	0,045
4	32	0,8	40	0,06
	metional	(E)-2-nonenal	benzaldeído	(E,E)-2,4-nonadienal
1	3	0,04	0,15	0,1
2	6	0,08	0,3	0,2
3	9	0,12	0,45	0,3
4	12	0,16	0,6	0,4

Todos os cromatogramas dos aldeídos associados às calibrações efetuadas encontram-se no anexo 1.

1.2.2. Homogeneidade de variâncias

Um dos principais testes e condições para que se proceda ao traçado da curva de calibração será a homogeneidade ao longo de toda a gama de trabalho explorada. Para isso, analisaram-se 10 réplicas das concentrações extremas da gama de trabalho, sendo elas o primeiro e último ponto do intervalo (balão 1 e balão 4 do método da adição padrão). Na tabela 9, está exemplificado o caso do isobutiraldeído, em que foi utilizada a razão entre a área do analito sobre a área do padrão interno. Os cálculos para os restantes aldeídos estão descritos no anexo 2. Em todos os aldeídos, confirmou-se a homogeneidade de variâncias, exceto o nonanal e (E,E)-2,4-nonadienal. Estes últimos requerem alterações a nível da gama de concentrações.

Tabela 9 - Sinal obtido das réplicas dos extremos do intervalo de concentrações para o isobutiraldeído

isobutiraldeído (A/A_{pi})		
Ensaio	Balão 1	Balão 4
1	0,54	1,75
2	0,56	1,58
3	0,60	1,63
4	0,72	1,72
5	0,72	1,33
6	0,59	1,81
7	0,71	1,97
8	0,75	1,56
9	0,72	1,71
10	0,89	2,03
Média	0,66	1,67
s^2	0,01	0,04
F_{exp}	3,59	
$F_{tab}(0,01;9;9)$	5,35	

Como o valor de F_{exp} é menor que $F_{tab}(0,01;9;9)$, então pressupõe-se que a diferença entre variâncias não será significativa, o que indicia homogeneidade dentro do intervalo de trabalho. Na figura 22, está representado o cromatograma respetivo das réplicas efetuadas para o isobutiraldeído.

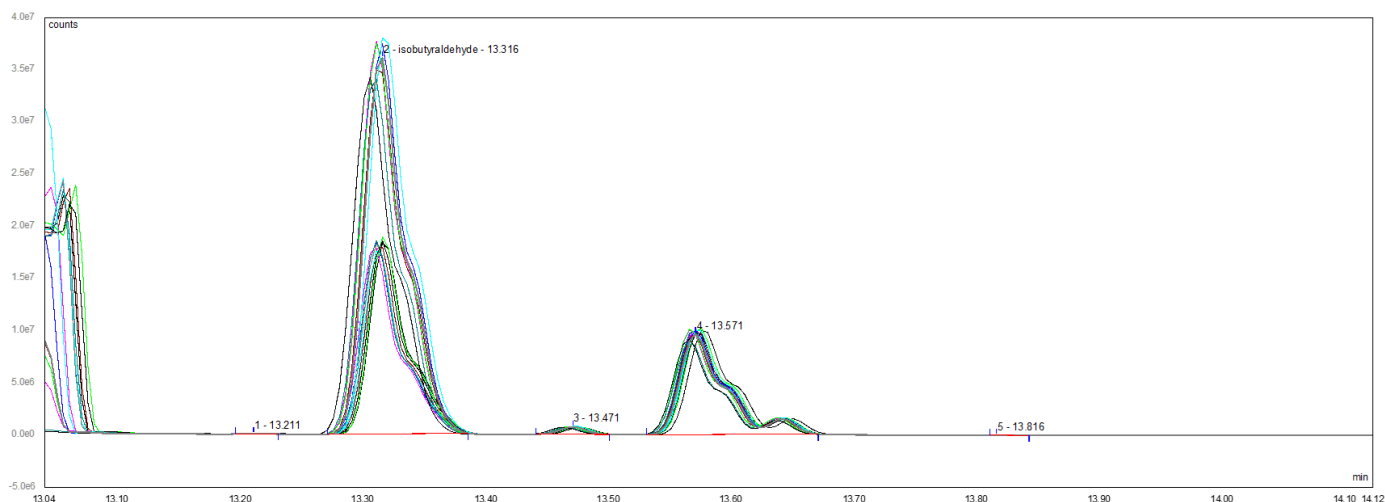


Figura 22 - Cromatograma representativo das réplicas efetuadas para a concentração mínima e máxima do isobutiraldeído.

1.2.3. Linearidade

De forma a proceder-se à curva de calibração, é necessário entender qual o melhor ajuste possível para o conjunto de dados escolhido. Geralmente, na aplicação de métodos com adição padrão, o ajuste linear será o mais apropriado para as situações. Ainda assim, é possível obter outros ajustes sem serem lineares, sendo eles quadráticos, logarítmicos, entre outros. Ora, foram efetuados alguns testes de forma a estabelecer-se o ajuste adequado.

Primeiro, uma análise visual irá oferecer alguma informação inicial importante acerca do ajuste dos dados.

Foram realizadas medições em triplicado para se efetuar a curva de calibração, tendo em conta as áreas do padrão interno (A_{pi}), áreas do analito em cada ponto do intervalo de trabalho (A), a concentração do analito (C_i) e a concentração do padrão interno (C_{pi}). Na tabela 10 estão representados todos os parâmetros necessários para a construção da mesma. Já na figura 23, está representado o gráfico corresponde à β -damascenona.

Tabela 10 - Dados utilizados para a curva de calibração por adição padrão da β -damascenona

C_{pi} ($\mu\text{g/L}$)	C_i ($\mu\text{g/L}$)	C_i/C_{pi}	A/A_{pi}
100	0	0,00	0,0072
100	8	0,08	0,0084
100	16	0,16	0,0096
100	24	0,24	0,0113
100	32	0,32	0,0125

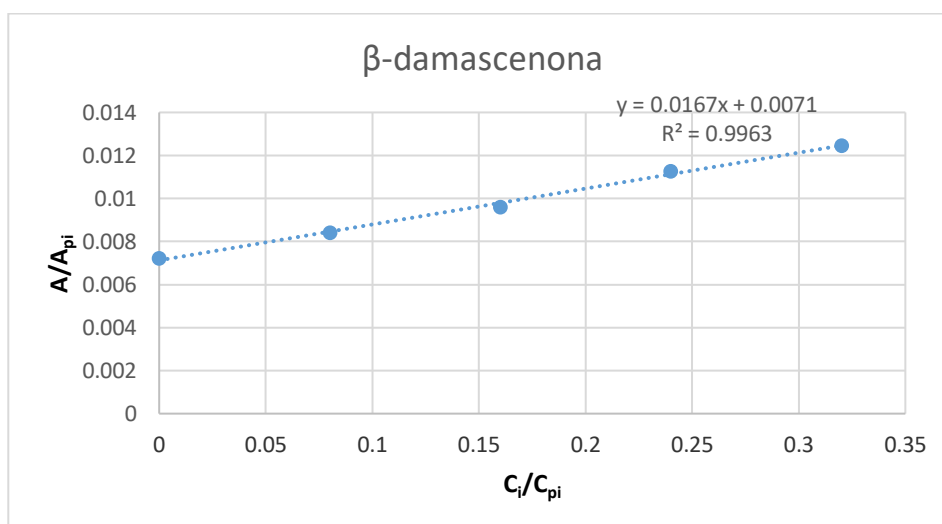


Figura 23 - Gráfico correspondente à β -damascenona, em que o eixo das abcissas é representado por C_i/C_{pi} e das ordenadas por A/A_{pi} .

Com uma primeira análise visual, pressupõem-se que os dados estejam ajustados corretamente para um ajuste linear. O valor de coeficiente de determinação R^2 também produz valores muito próximos de 1 ($R^2=0,9963$), o que indica linearidade à partida. Ainda assim, apesar da análise visual e o coeficiente de determinação já serem um passo inicial na investigação de linearidade, será necessário aplicar mais uma abordagem que confirme realmente o ajuste ideal.

Com isto, é possível verificar o ajuste através do padrão dos resíduos. O resíduo r_i pode ser calculado através da diferença dos valores teóricos da calibração y_i e o valor experimental observado $\hat{y}_i$, pela equação 15.

$$r_i = y_i - \hat{y}_i \quad (15)$$

Graficamente, os resíduos serão apresentados em função da concentração e não deverão apresentar qualquer tipo de padrão notório. Estes deverão estar distribuídos de forma aleatória ao longo do eixo das abcissas para que exista uma variância homogênea. Caso exista algum tipo de padrão formado no gráfico (padrão em V ou em funil), existirá a necessidade de modelar os dados com outro tipo de ajustes. Na figura 24 estão representados os gráficos de resíduos gerais típicos, assim como a forma como estes se podem apresentar ao longo do gráfico.

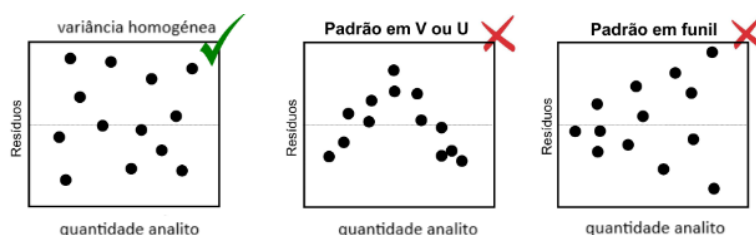


Figura 24 - Gráfico geral da distribuição dos resíduos ao longo da quantidade de analito adicionada. Figura adaptada de [59].

Na figura 25 está representada o gráfico referente ao resíduo da β -damascenona. Como se consegue visualizar, os resíduos aparentam total aleatoriedade ao longo do eixo das ordenadas, sem haver formação de algum tipo de padronização. Isto indica que o modelo linear será idealmente ajustado para este caso. Toda a informação sobre os dados utilizados na calibração e respetivo cálculo do resíduo para os restantes aldeídos estão presentes no Anexo 3.

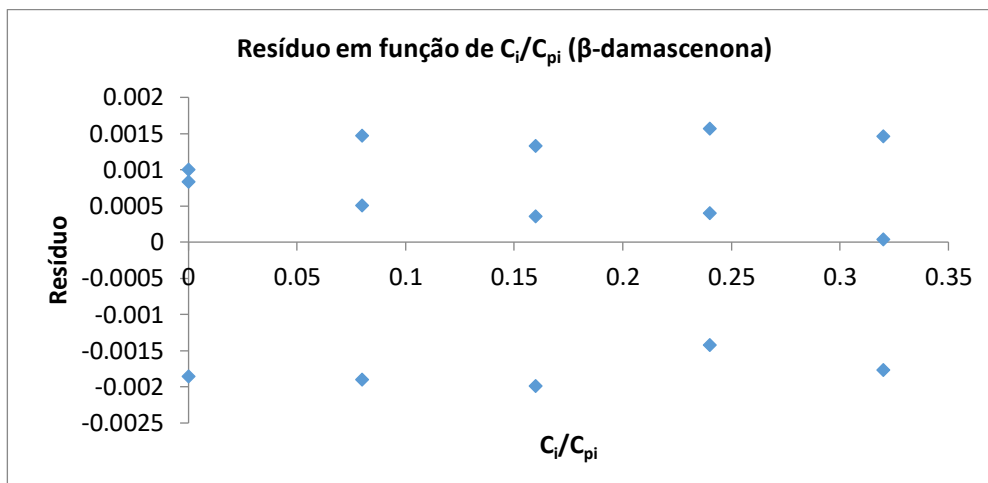


Figura 25 - Gráfico de resíduo em função de C_i/C_{pi}, para a β-damascenona.

Outro teste realizado para a confirmação entre ajuste linear e quadrático da reta foi o teste de Mandel, através da comparação estatística das variâncias residuais das retas de calibração lineares e quadráticas.

$$VT = \frac{DS^2}{s_{y/x(2)}^2} \quad (16)$$

$$DS^2 = (n-2)s_{y/x(1)}^2 - (n-3)s_{y/x(2)}^2 \quad (17)$$

A equação 16 representa o cálculo do valor de teste VT , onde $s_{y/x(2)}^2$ representa o desvio padrão residual relativo à calibração quadrática e DS^2 é calculado a partir da equação 17. Este valor de teste VT será comparado com um valor tabelado da distribuição de *Fischer*. Na equação 17, $s_{y/x(1)}^2$ será relativo ao desvio padrão residual da calibração linear, sendo que n será o total de pontos utilizados na calibração.

Portanto, sempre que $VT \leq F$, a função poderá ser ajustada linearmente. Já se $VT > F$, a função não poderá ser representada através de um modelo linear, sendo que será necessário utilizar funções de grau superior, ou então encurtar o intervalo de trabalho.

Sendo assim, na tabela abaixo estão descritos os parâmetros para o teste de Mandel, para a β -damascenona.

Tabela 11 - Parâmetros utilizados para o teste de Mandel, relativamente à β -damascenona

$S_{y/x(1)}$	$2,24 \times 10^{-8}$
$S_{y/x(2)}$	$2,79 \times 10^{-8}$
DS^2	$1,13 \times 10^{-8}$
VT	0,40
$F_{tab(0,01;1;5-3)}$	98,50

Com isto, o valor de teste foi comparado ao valor de F tabelado, para um grau de confiança de 99%. Como $VT < F_{tab}$ então conclui-se que a função poderá ser representada através de uma função de 1.^a ordem.

Os restantes resultados referentes aos testes de Mandel de todos os aldeídos estão descritos no Anexo 3.

Foram obtidos bons ajustes à linearidade para a maioria dos aldeídos em estudo, exceto para os casos do hexanal, do nonanal, do (*E*)-2-octenal e do (*E*)-2-nonenal. Estes compostos requerem novas otimizações e atribuições de novas gamas de concentrações.

1.3. Limites analíticos

Neste método, os limites analíticos foram determinados a partir dos parâmetros da reta de calibração, mais especificamente com o desvio padrão residual da reta. As equações 10 e 11 (anteriormente mencionadas) foram as utilizadas para o efeito. Portanto, na tabela 12, estão descritos o declive m , o desvio padrão residual da reta

$S_{y/x}$ e a respetiva determinação do LOD e LOQ. Como a concentração do padrão interno é de 100 ppb, então estima-se que a calibração efetuada para o furfural irá ter um LOD de 0,51 ppb.

Tabela 12 - Parâmetros utilizados para a determinação do LOD e LOQ (exemplo do furfural)

m	2,9
$S_{y/x}$	0,0051
LOD	$\frac{3}{m} * S_{y/x}$
C_i/C_{pi}	0,0051
LOD ($\mu\text{g/L}$)	0,51
LOQ	$\frac{10}{m} * S_{y/x}$
C_i/C_{pi}	0,017
LOQ ($\mu\text{g/L}$)	1,7

Os limites de deteção e quantificação dos restantes aldeídos estão presentes na tabela 13. Tanto o LOD e o LOQ do nonanal estão marcados a amarelo, pois limites abaixo de 0 não têm significado em contexto analítico. Estes valores deveram-se à fraca linearidade obtida aquando da sua calibração.

Tabela 13 - Valores de LOD e LOQ da gama de aldeídos. A amarelo, estão destacados valores abaixo de 0 de LOD e LOQ para o nonanal

	LOD $\mu\text{g/L}$	LOQ $\mu\text{g/L}$
isobutiraldeído	1,4	4,7
2-metibutanal	1,2	4,1
pentanal	0,031	0,10
hexanal	0,090	0,030
β -damascenona	2,7	9,0
nonanal	-1,9	-6,5
(E)-2-octenal	0,17	0,56
metional	0,54	1,8
(E)-2-nonenal	0,12	0,41
benzaldeído	0,049	0,16
(E,E)-2,4-nonadienal	0,032	0,11

1.4. Precisão

1.4.1. Repetibilidade

Para a avaliação da repetibilidade, analisaram-se 10 réplicas independentes do balão 2 da adição padrão. A repetibilidade do método foi analisada através da concentração obtida pela curva de calibração de cada composto. Visto que o nonanal, o (*E*)-2-octenal e o (*E*)-2-nonenal não cumpriram os requisitos pressupostos para a linearidade, avaliou-se a sua repetibilidade instrumental, através da resposta analítica (A/A_{pi}), pois a repetibilidade do método inclui a variabilidade do equipamento e a variabilidade da calibração. Como existe um maior erro associado à reta de calibração derivado da falta de ajuste dos pontos à reta, os valores de concentração obtidos a partir das mesmas seriam extrapolados. A tabela 14 apresenta a percentagem do desvio padrão relativo (RSD (%)), juntamente com o desvio padrão s_r e também o valor do limite de repetibilidade Δr .

Tabela 14 - Ensaios relativos à repetibilidade, através da concentração em $\mu\text{g/L}$ (exceto nonanal, (*E*)-2-octenal e (*E*)-2-nonenal, a partir do sinal analítico A/A_{pi})

Ensaio	isobutiraldeído	2-metibutanol	pentanal	hexanal	β -damascenona	nonanal (A/A_{pi})
1	9,89	18,34	0,27	0,77	83,95	0,016
2	12,55	23,25	0,33	0,94	98,79	0,017
3	11,62	21,61	0,31	0,88	97,84	0,019
4	12,70	23,55	0,33	0,88	103,04	0,014
5	12,67	23,08	0,30	0,83	92,21	0,014
6	11,64	21,31	0,29	0,76	94,65	0,014
7	12,66	23,43	0,32	0,85	104,91	0,028
8	12,53	22,37	0,31	0,88	110,75	0,017
9	13,04	23,58	0,70	0,85	101,99	0,021
10	11,20	21,03	0,29	0,80	95,93	0,016
Média	12,05	22,16	0,31	0,84	98,41	0,016
s_r	0,97	1,65	0,020	0,055	7,43	0,0023
RSD %	8,0	7,4	6,4	6,5	7,6	14,24
Δr	3,85	6,59	0,070	0,22	29,66	0,009

Ensaio	furfural	(E)-2-octenal (A/A _{pi})	metional	(E)-2-nonenal (A/A _{pi})	benzaldeído	(E,E)-2,4-nonadienal
1	112,17	0,0010	5,38	0,00093	0,95	0,13
2	118,29	0,00084	5,41	0,00062	0,87	0,07
3	116,67	0,00076	5,67	0,00073	0,91	0,07
4	121,71	0,00083	5,81	0,00070	0,88	0,07
5	119,76	0,0010	5,38	0,00094	0,90	0,13
6	120,07	0,00086	5,56	0,00086	0,89	0,11
7	121,71	0,0012	5,80	0,0013	0,88	0,16
8	124,29	0,00094	6,00	0,00086	0,91	0,13
9	124,22	0,00090	5,89	0,00083	0,91	0,15
10	119,28	0,00078	5,99	0,00088	0,98	0,12
Média	119,82	0,00091	5,69	0,00086	0,91	0,11
S _r	3,62	0,00013	0,25	0,00017	0,034	0,031
RSD %	3,0	14,1	4,3	20,1	3,8	27,2
Δr	14,43	0,00051	0,98	0,00069	0,14	0,12

Os ensaios 9, 7 e 7 do pentanal, nonanal e (E)-2-nonenal, respetivamente, estão assinalados a vermelho por possibilidade de o valor obtido ser um *outlier*. Foi executado o teste de *Grubbs* nestes ensaios (teste explicitado no anexo 4), através do qual se confirmou que os ensaios eram, de facto, *outliers*, à exceção do (E)-2-nonenal.

Quanto aos valores do limite de repetibilidade, foi utilizado um valor de teste *t* de *Student* para um grau de 99% de confiança, com 9 graus de liberdade, onde $t_{0,01,(10-1)} = 2,82$.

Através dos valores dos desvios padrão relativos, é possível afirmar que a maioria dos compostos apresentou uma repetibilidade do método aceitável (sombreados a verde), tendo em conta que se considerou 10% como o máximo de RSD aceitável para a análise. Em dois casos, foram observados valores de RSD relativamente altos (a vermelho, na tabela 14), sendo que o (E,E)-2,4-nonadienal não apresentou boa repetibilidade do método, e o (E)-2-nonenal não apresentou bons resultados em termos de repetibilidade instrumental. Apenas no caso do (E)-2-octenal e do nonanal, o valor de RSD obtido mostrou-se um pouco acima do limite estabelecido (a amarelo) para a repetibilidade instrumental. Estes assinalados requerem novas análises, podendo-se dever ao facto de a gama de concentrações não estar ajustada na gama linear.

1.4.2. Precisão intermédia

A precisão intermédia de um método analítico acolhe um maior número de fatores de variabilidade, pelo que é esperado que os valores de desvio padrão relativos sejam maiores do que na repetibilidade. Um pouco à imagem da repetibilidade, analisar-se-á a precisão intermédia do método, exceto os casos do nonanal, (E)-2-octenal e (E)-2-nonenal, em que foi avaliado a precisão intermédia instrumental (através do sinal analítico A/A_{pi}).

Foram feitas várias análises durante três dias diferentes. Devido à instabilidade da matriz da amostra, foram utilizadas diferentes amostras em cada um dos dias. O número de ensaios foi também diferente entre cada série, sendo que no primeiro dia foram efetuados 5 ensaios, no segundo dia 10 ensaios e no terceiro dia 3 ensaios. Ora, devido a esse diferente número de ensaios nas 3 séries, poderá ser usada a equação 18, referente ao desvio padrão relativo combinado ($RDS_{rpooled}$).

$$RDS_{rpooled} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)RDS_1^2 + (n_2 - 1)RDS_2^2 + \dots + (n_k - 1)RDS_k^2}{n_1 + n_2 + \dots + n_k - k}} \quad (18)$$

Na tabela 15, estão referidos os parâmetros necessários para o cálculo do RDS em precisão intermédia, para o exemplo do isobutiraldeído.

Tabela 15 - Parâmetros requisitados pela equação 18 (exemplo do isobutiraldeído)

	dia 1	dia 2	dia 3
	1,02	9,9	9,04
	1,31	12,5	7,01
	1,15	11,6	9,28
	2,02	12,7	
	1,11	12,7	
		11,6	
		12,7	
		12,5	
		13,0	
		11,2	
s_r	0,401	0,97	1,24
Média (em µg/L)	1,32	12,05	8,44
RDS	0,30	0,080	0,15
n-1	4	9	2
(n-1)RDS²	0,37	0,058	0,043

Com todos os parâmetros calculados, tem-se que:

$$RDS_{rpooled} = \sqrt{\frac{0,037 + 0,058 + 0,043}{4 + 9 + 2}}$$

$$RDS_{rpooled} = 0,1767$$

O exemplo do isobutiraldeído apresenta um RSD de 17,67% para a precisão intermédia, algo que é positivo, pois encontra-se abaixo do limite estabelecido de 20%. Apesar destes valores serem relativamente baixos, é importante lembrar que três dias não deverão ser suficientes para se estabelecer uma boa estimativa de RSD relativos à precisão intermédia. Apesar do número de amostras analisadas ter sido o recomendado ($n \geq 15$), será preferível estender o número de séries ao longo do tempo pelo menos um mês (por exemplo, através da realização de duplicados a cada 2 dias, por 4 semanas), para que se estabeleça com confiança um valor real de RSD. Os restantes valores de RSD estão apresentados na tabela 16. Através da tabela 16, observa-se que todos os compostos apresentam bons resultados na precisão intermédia do método, pois estão abaixo do limite de 20%. Em casos como o nonanal, (E)-2-nonenal e (E,E)-2,4-nonadienal, apresentaram valores superiores ao limite estipulado.

Tabela 16 - Valores de $RSD_{rpooled}$ dos aldeídos em precisão intermédia

Aldeídos	$RSD_{rpooled}$ (%)
2-metilbutanal	17,5
pentanal	8,19
hexanal	15,9
β -damascenona	12,1
nonanal	22,6
furfural	5,01
(E)-2-octenal	12,9
metional	4,66
(E)-2-nonenal	20,3
benzaldeído	3,17
(E,E)-2,4-nonadienal	26,7

1.5. Ensaios de Recuperação

Recorreu-se anteriormente a curvas de calibração externas como forma de implementar e validar o método. Como forma de verificar a veracidade dos valores obtidos, foram feitas medições de amostras com fortificação. Essa fortificação passa pela adição de uma concentração previamente conhecida da solução padrão, em que se analisa em seguida a percentagem de recuperação. A equação 19 será a equação pela qual é calculada a quantidade recuperada de analito na amostra.

$$\%Rec = \frac{C_{fortificada} - C_{matriz}}{C_{adicionado}} * 100\% \quad (19)$$

O termo $C_{adicionado}$ representará a quantidade conhecida de analito adicionado, C_{matriz} será a concentração da amostra sem nenhum padrão adicionado e $C_{fortificado}$ será a concentração da amostra na qual foi adicionada a quantidade de analito.

Ora, as fortificações efetuadas através do método anterior de calibração não apresentaram valores satisfatórios dentro do intervalo de recuperação considerado de 80%-120%.

A maior parte dos aldeídos apresentaram valores de fortificação bastante fora do intervalo, a rondar recuperações que vão dos 30% até aos 160%. Com isto, verificou-se a existência clara de efeitos sistemáticos (efeito de matriz), que conduziram à mudança de abordagem em termos de calibração.

Por isso, a calibração através do método da adição de padrão conseguirá ter em conta esse efeito sistemático, pois a calibração já é feita tendo em conta as interferências causadas pela matriz. No fundo, a própria adição padrão já será uma “fortificação”, pelo que não será necessário o cálculo da recuperação através da equação 19.

1.6. Quantificação dos compostos voláteis

Para quantificar qualquer analito a partir da aplicação de um método de adição padrão com padrão interno, é necessário que uma curva seja efetuada, para que este analito esteja sob influência dos interferentes da matriz em toda a gama de concentrações. Com isto, o valor de x referente à amostra analisada será obtido quando y for igual a 0. Ou seja, haverá uma extrapolação da reta quando a curva passará no ponto 0 do eixo das ordenadas. Isto vai indicar então que $x = \frac{y-b}{m}$, ou então, $x = \frac{-b}{m}$ pois $y = 0$.

Para a situação deste estudo, cuja quantificação é baseada na adição de padrões de analitos e um padrão interno, esta expressão tomará a forma da equação 20:

$$\frac{C}{C_{pi}} = \frac{-b}{m} \quad (20)$$

O termo x será representado pela concentração do analito sobre a concentração conhecida do padrão interno, $\frac{C}{C_{pi}}$, m representa o declive e b representa a ordenada na origem.

Tomando como exemplo a β -damascenona, os valores do declive e da ordenada na origem são $m = 0,0167$ e $b = 0,0071$, respetivamente. Como a concentração da substância origina um valor positivo, o cálculo é efetuado tendo em conta o valor absoluto, pois $\frac{-0.0071}{0.0167}$ origina valores negativos. Assim, tem-se que:

$$\frac{C}{C_{pi}} = \left| \frac{-0.0071}{0.0167} \right|$$
$$\frac{C}{C_{pi}} = 0,4270$$

Como a concentração utilizada de padrão interno é $C_{pi} = 100 \mu\text{g/L}$, então $C = 42,71 \mu\text{g/L}$. No entanto, é necessário ter em conta que a cerveja foi diluída duas vezes na última etapa da adição de padrão (25,00 mL de amostra num balão de 50,00 mL).

Isto faz com que a concentração real da β -damascenona seja $C = 85,41 \mu\text{g/L}$. Para esta situação, este composto apresenta uma concentração que se enquadra com os valores obtidos na literatura para este composto, em cerveja [60].

Na tabela 17, estão discriminadas as concentrações encontradas para os aldeídos tendo em conta a curva de utilização efetuada, em triplicado. Os valores de declive e ordenada na origem utilizados para os cálculos podem ser encontrados no Anexo 3.

Tabela 17 - Concentrações de analitos obtidas para a amostra (n.d. – não detetável; n.q. – não quantificável); Gama de concentrações retiradas de ^[1] Dayana et al [32], ^[2] Moreira et al [61], ^[3] Saison et al [31]

	C amostra ($\mu\text{g/L}$)	Gama C na literatura ($\mu\text{g/L}$)
isobutiraldeído	13,28	1 - 229 ^[1]
2-metilbutanal	24,52	0,7 - 60,41 ^[1]
pentanal	n.q.	0,083 - 0,808 ^[2]
hexanal		0,5 - 36,01 ^[1]
β -damascenona	85,42	42 - 419 ^[3]
nonanal		1,63 - 24,08 ^[1]
furfural	13	9 - 457 ^[3]
(E)-2-octenal		0,254 - 0,796 ^[2]
metional	n.d.	0,4 - 5,9 ^[3]
(E)-2-nonenal		0,03 - 20,08 ^[1]
benzaldeído	0,86	0,5 - 30,9 ^[1]
(E,E)-2,4-nonadienal	n.d.	n.d. ^[2]

Assim sendo, tanto o metional como o (E,E)-2,4-nonadienal não serão detetáveis, pois apresentam concentrações abaixo dos limites de deteção anteriormente apresentados. Já o pentanal apresenta uma baixa concentração, mas não o suficiente para que seja quantificável. Quanto aos aldeídos assinalados a laranja, não foi efetuado o cálculo para a concentração devido à falta de linearidade apresentada e à inadequação do ajuste dos pontos à reta, de acordo com a informação anteriormente discutida e apresentada no anexo 3. O aldeído (E,E)-2,4-nonadienal, por norma, não é detetado em matrizes de cerveja. Ainda assim, este composto está normalmente presente em matrizes como o mosto, com concentrações entre $0,10 \mu\text{g/mL}$ e $0,90 \mu\text{g/mL}$ [65]. Por questões de tempo, não foi possível otimizar a gama de trabalho para os aldeídos que apresentam falta de linearidade. Todas as

concentrações obtidas a partir deste método vão de encontro com o esperado e o encontrado na literatura [31,32,61].

A mesma gama de trabalho foi utilizada noutros produtos de cerveja, com diferentes características entre si. Na tabela 18, estão descritas as concentrações obtidas para o leque de cervejas testado. A amostra 2 caracteriza-se por não ter etanol na sua matriz. Na amostra 3, foi testado o envelhecimento natural e a evolução do perfil de aldeídos formado ao longo do tempo de armazenagem, à temperatura ambiente e no escuro, para o mesmo tipo de matriz de cerveja. Na primeira amostra 3, foi utilizada uma cerveja fresca. Na segunda amostra 3, foi utilizado um produto que se havia fabricado há 6 meses. Quanto à terceira amostra 3, a medição foi feita numa amostra fora de validade (passados 12 meses de armazenagem). Quanto à amostra 4, apresenta-se como uma matriz mais complexa, por conter um maior teor de açúcares na sua composição.

Tabela 18 - Concentração de aldeídos em diferentes estilos de cerveja (n.d. – não detetável)

	C amostra 2 (µg/L)	C amostra 3 (µg/L)	C amostra 3 (6 meses) (µg/L)	C amostra 3 (12 meses) (µg/L)	C amostra 4 (µg/L)
isobutiraldeído	16,36	17,87	14,54	31,43	43,37
2-metilbutanal	48,6	25,85	26,12	86,06	77,15
pentanal	0,22	0,11	0,12	0,26	0,38
β -damascenona	384,42	144,37	139,56	155,8	124,8
furfural	78,64	13,04	164,18	279,46	35,18
metional	2,74	1,1	0,63	4,08	5,71
benzaldeído	0,86	0,9	1,09	1,4	2,55
(E,E)-2,4-nonadienal	n.d.	n.d.	n.d.	0,017	0,045

A análise foi efetuada para os aldeídos que apresentaram resultados satisfatórios a nível de linearidade e precisão na calibração. Na tabela 18, destacam-se o alto teor em β -damascenona na amostra 2, assim como a evolução geral do teor de aldeídos na amostra 3, ao longo do tempo de armazenagem. À exceção do furfural, não parece haver um aumento acentuado entre o produto fresco e o produto após 6 meses. A diferença é mais visível quando se compara a amostra de 12 meses com as duas anteriormente mencionadas. Na tabela 18, estão assinaladas a amarelo as

medições onde não foram obtidos valores de linearidade razoáveis para se efetuar a extrapolação. Assim sendo, apesar de existir uma concentração significativamente maior em teor de isobutiraldeído e 2-metilbutanal na amostra 3 com 12 meses de armazenagem, estes apresentam um maior erro associado na obtenção da concentração. Quanto à amostra 4, esta apresenta a particularidade de ter maiores teores de isobutiraldeído do que as restantes, bem como de metional e benzaldeído. Todas as concentrações obtidas nos diferentes produtos da tabela 18 apresentam valores concordantes aos referidos na literatura (tabela 17).

2. Discussão

Inicialmente, o método foi projetado de forma diferente, ao utilizar um modo de MS diferente ao do SIM, sendo este o *Multiple Reaction Monitoring* (MRM). Enquanto o modo SIM tem apenas o Q1 como modo seletivo, o modo MRM funciona com Q1 e Q3 em modo seletivo, com os iões a serem fragmentados na célula de colisão q2. Apesar de, na teoria, este modo ter a possibilidade de ser mais seletivo, o mesmo não apresentou fiabilidade nos resultados, sendo que os padrões não apresentaram bons resultados ao nível da repetibilidade. O facto de não se ter utilizado qualquer reagente derivatizante fez com que os aldeídos não fossem volatilizados nem extraídos com facilidade. Ora, o reagente derivatizante exerce um papel fundamental neste processo, sendo o PFBHA o composto utilizado. Este composto reage com grupos carbonilo dos aldeídos, o que faz com que se tornem mais voláteis, e que sejam mais facilmente retidos no *headspace* do *vial*. A reação entre o derivatizante e o aldeído pode levar à isomerização do composto, ocorrendo rearranjos estruturais devido à natureza reativa do carbonilo, pois o aldeído é convertido noutra forma com diferente estrutura, mas com a mesma massa molecular (exemplo dos cromatogramas do isobutiraldeído, pentanal, hexanal, nonanal, furfural, (*E*)-2-nonenal e (*E,E*)-2,4-nonadienal, no anexo 1). Nos casos onde os aldeídos apresentam dois picos, a sua quantificação procede-se através da soma de ambas as áreas dos mesmos.

Quanto às condições do método utilizadas, tiveram como base o artigo de *Moreira et al* [61], após otimização do método a nível de rampa de temperatura, tempo de extração, temperatura de extração e concentração de reagente derivatizante e de padrão interno. Após o aquecimento e dessorção dos aldeídos no injetor por parte da fibra, esta geralmente é direcionada para um módulo de condicionamento, onde ocorre a limpeza e a descontaminação de possíveis compostos remanescentes. Não sendo possível utilizar o módulo de condicionamento neste método, recorreu-se ao modo *split* durante 5 minutos. Em modo *split*, a fibra fica retida no injetor, com o intuito de haver a dessorção total de analitos indesejados, com o auxílio de um maior fluxo de gás de arraste e temperaturas mais altas. Com isto, atenua a possibilidade de contaminação cruzada nas medições seguintes. Quanto ao padrão interno, o composto *p*-fluorobenzaldeído foi o utilizado nos ensaios, com o intuito de corrigir possíveis variações instrumentais e experimentais.

Quanto à validação do método, a identificação e seletividade dos compostos foi efetuada com os respectivos m/z caraterísticos obtidos na literatura. No que toca ao intervalo de concentrações, o teste de homogeneidade de variâncias mostrou que, em todos os aldeídos, existe homoscedasticidade, o que indica a uniformidade da dispersão de erros em toda a faixa, não sendo necessária a transformação de dados ou a escolha de modelos diferentes. No que diz respeito à linearidade, apenas alguns compostos cumpriram com os pressupostos, sendo eles o isobutiraldeído, o 2-metilbutanal, o pentanal, a β -damascenona, o furfural, o metional, o benzaldeído e o (E,E)-2,4-nonadienal. Os restantes aldeídos apresentaram um baixo ajuste dos pontos à reta. Possíveis propostas de correções que levariam a uma melhoria nos dados seriam o aumento da gama de concentrações utilizadas ou a utilização de, pelo menos, mais um ponto de calibração. Quanto à precisão, dos aldeídos que apresentaram parâmetros razoáveis a nível da linearidade, apenas o (E,E)-2,4-nonadienal apresentou valores de RSD fora das especificações. O método também mostrou capacidade e versatilidade na aplicação em outros tipos de amostras, ao conseguir permitir estudar o perfil aromático de uma cerveja em envelhecimento (amostra 3 da tabela 18).

Quanto à evolução do teor em aldeídos ao longo do tempo de armazenagem da cerveja, o isobutiraldeído, o 2-metilbutanal, o metional e especialmente o furfural são os aldeídos que apresentam um acréscimo de concentração mais elevado que os restantes. O furfural, apresentando um maior aumento relativo em relação aos restantes, considera-se então como um dos principais marcadores químicos a ter em conta no que toca ao fator do tempo de prateleira, confirmando assim o seu comportamento anteriormente observado em estudos realizados [64]. Em amostras naturalmente envelhecidas, o seu aumento poderá estar relacionado à presença de aminoácidos livres na cerveja, sendo estes precursores naturais na formação de aldeídos [63]. Outra possibilidade a ter em conta será a libertação dos aldeídos ligados através de adutos, por exemplo com hidrogenossulfito, promovida por alterações nas condições de armazenamento, como o pH ou a temperatura em que a cerveja foi armazenada [63].

Conclusão

Este trabalho teve como objetivo a implementação e a validação de um método que determinasse e quantificasse compostos voláteis na cerveja, mais propriamente os aldeídos, através de HS-SPME-GC-MS. O método mostrou ser adequado para a quantificação da maioria dos aldeídos analisados, nomeadamente o isobutiraldeído, o 2-metilbutanal, o pentanal, a β -damascenona, o furfural, o metional, o benzaldeído e o (*E,E*)-2,4-nonadienal, para diferentes tipos de amostra de cerveja. Os restantes aldeídos carecem de alterações e subsequente validação.

A quantificação foi realizada recorrendo ao método de adição de padrão com padrão interno, com ajuste linear. As gamas de trabalho para os aldeídos foram os seguintes: 3,1 – 12,4 $\mu\text{g/L}$ para o isobutiraldeído; 3,2 – 12,8 $\mu\text{g/L}$ para o 2-metilbutanal; 0,1 – 0,4 $\mu\text{g/L}$ para o pentanal; 8 – 32 $\mu\text{g/L}$ para a β -damascenona; 10 – 40 $\mu\text{g/L}$ para o furfural; 3 – 12 $\mu\text{g/L}$ para o metional; 0,15 – 0,6 $\mu\text{g/L}$ para o benzaldeído; 0,1 – 0,4 $\mu\text{g/L}$ para o (*E,E*)-2,4-nonadienal.

Os limites de deteção e quantificação variaram desde os 0,031 $\mu\text{g/L}$ até 2,7 $\mu\text{g/L}$, e entre 0,1 $\mu\text{g/L}$ e 9,0 $\mu\text{g/L}$, sendo que os valores mais baixos corresponderam ao pentanal e os mais altos à β -damascenona.

Quanto à precisão do método, esta foi avaliada ao nível da repetibilidade e da precisão intermédia. Os valores de RSD na repetibilidade variaram entre 3,0% e 27,2%, enquanto na precisão intermédia os RSD apresentaram valores superiores a 3,17% e inferiores a 26,7%. Isto é indicativo da presença de uma repetibilidade e precisão intermédia aceitáveis, dentro dos parâmetros estabelecidos.

As amostras utilizadas no método de adição de padrão com padrão interno apresentaram valores concordantes com os referidos na literatura.

Foram feitos ensaios em diferentes produtos, onde se quantificou os aldeídos em duas cervejas distintas, bem como o tempo de armazenagem noutra cerveja. Em cada um deles, observam-se características diferentes em termos de perfil aromático. A cerveja da amostra 2 apresentou tendencialmente maior teor em β -damascenona, a cerveja da amostra 4 mostrou um maior teor em benzaldeído e metional, e no estudo do tempo de armazenagem com a cerveja da amostra 3, ocorreu um aumento de concentração na maioria dos compostos, à medida que o tempo de armazenagem da

cerveja aumenta, destacando-se o furfural entre eles todos. Através de estudos anteriormente realizados, comprovou-se realmente que o furfural seria um marcador químico importante no que toca ao envelhecimento e ao aparecimento de *off-flavours* [64]. De todas as cervejas analisadas, a β -damascenona apresentou a maior concentração quantificada, na amostra 2.

São sugeridos alguns trabalhos futuros a fim de melhorar o desempenho e a robustez do método.

A caracterização do processo cervejeiro desde a etapa inicial até ao produto final será um passo a ser acompanhado, pelo que seria de grande importância caracterizar o perfil aromático presente no mosto ao longo das diversas fases de fabrico, assim como na cerveja em fermentação. Assim, existirá um maior controlo sobre o perfil e a influência que cada etapa tem no teor em compostos voláteis, o que trará uma informação útil para estudos futuros.

Em ensaios preliminares com outras matrizes de cerveja, verificou-se que os aldeídos (*E*)-2-nonenal, (*E*)-2-octenal, hexanal e nonanal apresentaram comportamentos promissores que permitirão a sua quantificação no futuro. Isto requer otimizações futuras tendo em conta o comportamento destes compostos em diferentes matrizes.

Outro passo interessante a estudar poderá ser a avaliação de diferentes tipos de matéria-prima utilizadas no processo cervejeiro (lúpulo e malte), conhecendo-se assim o potencial à partida que cada ingrediente tem a oferecer à cerveja.

Referências Bibliográficas

- [1] “Super Bock Group: Quem somos”.
<https://superbockgroup.com/grupo/quem-somos> (acedido a Ago. 28, 2023)
- [2] “Super Bock Group: História”.
<https://www.superbock.pt/historia> (acedido a Ago. 28, 2023)
- [3] Garret Oliver, *The Oxford Companion to Beer*. Oxford University Press, 2011.
- [4] Meußdoerffer F, Zarnkow M (2014) *Das Bier. Eine Geschichte von Hopfen und Malz*. München: Verlag C. H. Beck.
- [5] J. J. Mark, «Beer in the Ancient World», *World History Encyclopedia*, 2011.
<https://www.worldhistory.org/article/223/beer-in-the-ancient-world/>. (acedido a Ago. 29, 2023)
- [6] Ignazio Cabras & David M. Higgins (2016) Beer, brewing, and business history, *Business History*, 58:5, 609-624, DOI: 10.1080/00076791.2015.1122713
- [7] Poelmans, Eline & Swinnen, Johan. (2012). A Brief Economic History of Beer. *The Economics of Beer*. DOI: 10.1093/acprof:oso/9780199693801.003.0001.
- [8] W. Kunze, *Technology Brewing and Malting*, 3ª ed. VLB Berlin, 2004.
- [9] Raihofer L, Zarnow M, Gastl M, Hutzler M. (2022) A short history of beer brewing: Alcoholic fermentation and yeast technology over time: Alcoholic fermentation and yeast technology over time. doi: 10.15252/embr.202256355.
- [10] Dura S. (2020), “Brewery: Beer making process”, The Science Notes
- [11] Wunderlich S, Back W, Overview of Manufacturing Beer: Ingredients, Processes, and Quality Criteria. Beer in Health and Disease Prevention, Pages 3-16, 2009
- [12] Ted Goldammer, *The Brewer's Handbook: The Complete Book to Brewing Beer*, Chapter 1, 3ª ed. Apex Publishers, 2022
- [13] Buttrick P., “*The Oxford Companion to Beer definition of Mashing*”, Beer & Brewing, <https://beerandbrewing.com/dictionary/BkD3llopul/>. (acedido a Set. 03, 2023)

- [14] Padinha, Sara. (2016) Valorização da drecche para desenvolvimento de novos produtos [Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto], <https://recil.ensinulusofona.pt/handle/10437/7212>
- [15] Benson, Mike. *The Crisp Guide to Wort Boiling*, <https://crispmalt.com/news/the-crisp-guide-to-wort-boiling/> (acedido a Set. 07, 2023)
- [16] D. E. Briggs, C. A. Boulton, P. A. Brookes, e R. Stevens, «Wort boiling clarification, cooling and aeration», *Brewing: Science and Practice*. Woodhead Publishing Limited, c. 10, pp 326-362, 2004, doi: 10.1533/9781855739062.326
- [17] Chris, Boulton, and David Quain (2001) *Brewing yeast and fermentation*. New York: Blackwell Science.
- [18] Ted Goldammer, *The Brewer's Handbook: The Complete Book to Brewing Beer*, Chapter 15, 3ª ed. Apex Publishers, 2022
- [19] Ted Goldammer, *The Brewer's Handbook: The Complete Book to Brewing Beer*, Chapter 17, 3ª ed. Apex Publishers, 2022
- [20] Kissmeyer A., "The Oxford Companion to Beer definition of Bottling, Beer & Brewing, <https://beerandbrewing.com/dictionary/hEa78YIOlu/> (acedido a Set. 09, 2023)
- [21] Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P., and Pillay, B. (2017) Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing*, 123: 13–23. doi: 10.1002/jib.389.
- [22] He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J. and Chen, L. (2014), Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review, *Journal of the Institute of Brewing*, 120: 157–163. DOI: 10.1002/jib.145
- [23] Baldus, Matthias & Klie, Rüdiger & Biermann, Max & Kreuschner, Pascal & Hutzler, Mathias & Methner, Frank-Jürgen. (2018). On the Behaviour of Dimethyl Sulfoxide in the Brewing Process and its Role as Dimethyl Sulfide Precursor in Beer. *BrewingScience*. 71. 10.23763/BrSc18-01baldus.
- [24] Martins C, Brandão T, Almeida A, Rocha SM. Enlarging Knowledge on Lager Beer Volatile Metabolites Using Multidimensional Gas Chromatography. *Foods*. 2020 Sep 11;9(9):1276. doi: 10.3390/foods9091276.

- [25] Callemien, D., Dasnoy, S., and Collin, S. (2006) Identification of a stale beer-like odorant in extracts of naturally aged beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006 54 (4), 1409-1413. doi: 10.1021/jf051772n
- [26] Huige, N. (1993) Progress in Beer Oxidation Control, *Beer and Wine Production*, 64-97. doi: 10.1021/bk-1993-0536.ch005
- [27] De Keukeleire, D.. (2000). *Fundamentals of beer and hop chemistry*. *Química Nova*, 23(1), 108–112. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>
- [28] Hashimoto, N. Oxidation of higher alcohols by melanoidins in beer. *Journal of the Institute of Brewing*. 1972, 78, 43–51.
- [29] Baert, J., Aerts, G. On the Origin of Free and Bound Staling Aldehydes in Beer, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (2012) 60 (46), 11449-11472, DOI: 10.1021/jf303670z
- [30] Harrison, G.A.F. (1970), THE FLAVOUR OF BEER—A REVIEW. *Journal of the Institute of Brewing*, 76: 486-495. doi: 10.1002/j.2050-0416.1970.tb03333.x
- [31] Saison, D. et al (2009), Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chemistry*, 114: 1206-1215.
- [32] Aguiar, Dayana. (2021) Evolution of staling aldehydes on lager beer stability: impact of maritime transport and storage conditions [Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências Exatas e da Engenharia, Universidade da Madeira], <https://digituma.uma.pt/handle/10400.13/4055>
- [33] Filipowska W, Jaskula-Goiris B, et al. (2021) On the contribution of malt quality and the malting process to the formation of beer staling aldehydes: a review. *Journal of the Institute of Brewing*.
- [34] Mutz, YS, Rosario, DKA, Conte-Junior, CA. Insights into chemical and sensorial aspects to understand and manage beer aging using chemometrics. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2020; 19: 3774–3801. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12642>
- [35] Rodrigues, J., Almeida, P. (2009) E-2-nonenal and β -Damascenone in Beer, *Beer in Health and Disease Prevention*, 38: 395-402.
- [36] Elisangela Passos, “Cromatografia gasosa, cromatografia líquida e suas aplicações”, Aula 9 (acedido a Set. 10, 2023)

- [37] Agilent Technologies, *"Fundamentals of Gas Chromatography: Hardware"*, 2019.
- [38] Korytár, P. et al (2002), Practical fast gas chromatography: Methods, instrumentation and applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, volume 21. 9-10: 558-572.
- [39] Harvey, D., Gas Chromatography. (2021). DePauw University. <https://chem.libretexts.org/@go/page/152402> (acedido a Set. 11, 2023)
- [40] Evers, Richard. (2014). Development of a Liquid Chromatography Ion Trap Mass Spectrometer Method for Clinical Drugs of Abuse Testing with Automated On-Line Extraction Using Turbulent Flow Chromatography. 10.13140/2.1.2125.1367.
- [41] OpenPR Worldwide Public Relations (2020), Quadrupole Mass Spectrometer (MS) Market to Witness Robust Expansion by 2025, <https://www.openpr.com/news/2088682/quadrupole-mass-spectrometer-ms-market-to-witness-robust> (acedido a Set. 12, 2023)
- [42] R. Paschotta, article on Microchannel Plates in the *RP Photonics Encyclopedia*, https://www.rp-photonics.com/microchannel_plates.html (acedido a Set. 12, 2023)
- [43] Schmidt, Kamila & Podmore, Ian. (2015). Solid Phase Microextraction (SPME) Method Development in Analysis of Volatile Organic Compounds (VOCS) as Potential Biomarkers of Cancer. *Journal of Molecular Biomarkers & Diagnosis*. 06. 10.4172/2155-9929.1000253.
- [44] Hansen, Frederik André & Pedersen-Bjergaard, Stig. (2019). Emerging Extraction Strategies in Analytical Chemistry. *Analytical Chemistry*. 92. 2-15. 10.1021/acs.analchem.9b04677.
- [45] Jalili, Vahid & Barkhordari, Abdullah & Ghiasvand, Alireza. (2019). A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: *A review of reviews*. *Microchemical Journal*. 152. 104319. 10.1016/j.microc.2019.104319.
- [46] Paiva, A.C., Crucello, J., Cavalcanti Ferreira, V.H., Hantao, L.W. (2022). Solid-Phase Microextraction and Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography for Food Analysis. In: Koolen, H. (eds) Mass Spectrometry for Food Analysis. *Methods and Protocols in Food Science*. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2107-3_14

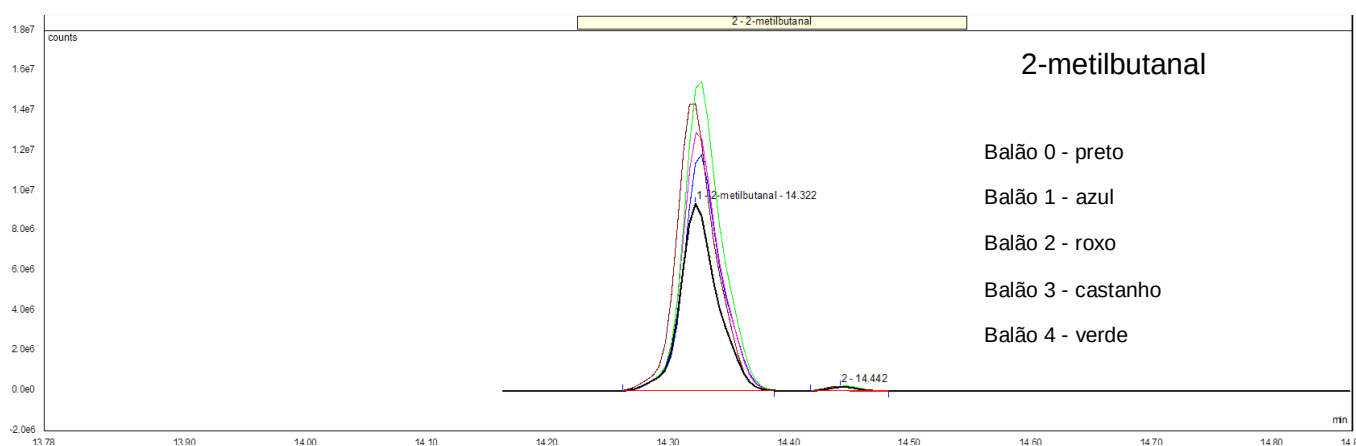
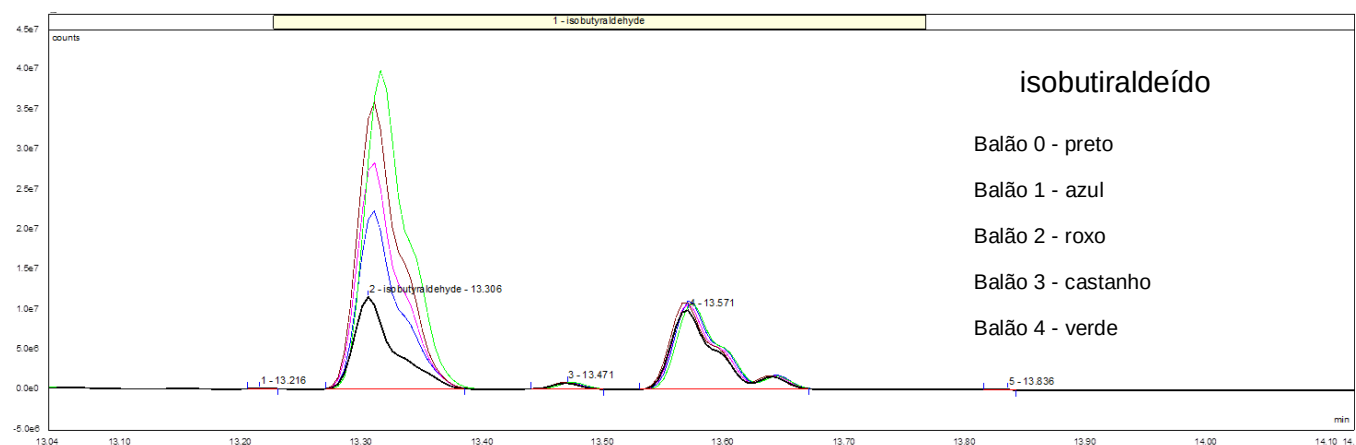
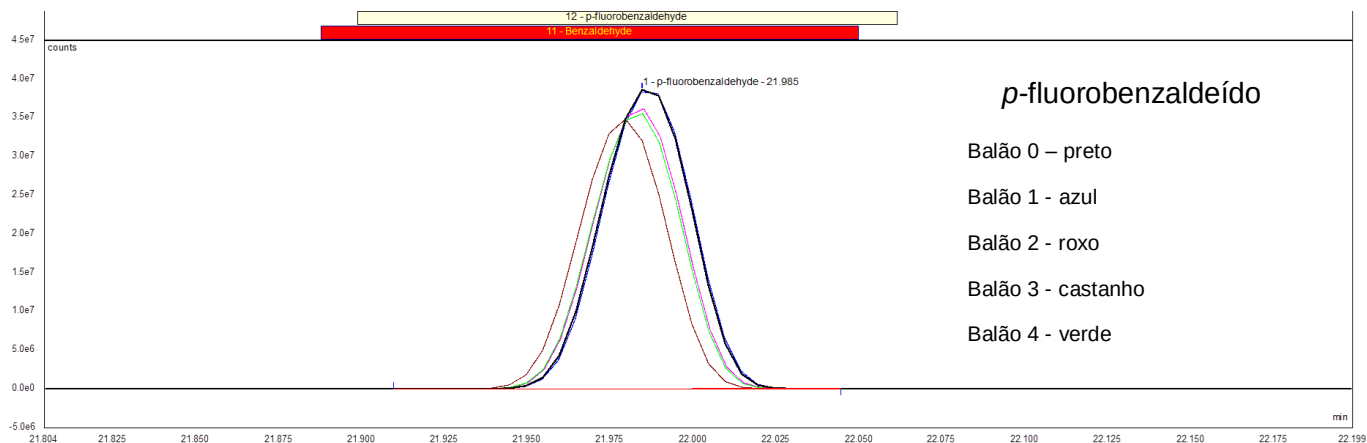
- [47] Vayalappil, Muraleedharan. (1998). Method Validation: An ISO 17025 Presentation. 10.13140/RG.2.2.14838.63049.
- [48] «Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology (Q2-R1)». *International Conference on Harmonisation*, 2006.
- [49] M. Thompson, S. L. R. Ellison, e R. Wood, «Harmonized guidelines for single-laboratory», *Pure and Applied Chemistry*, vol. 74, n. 5. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), pp. 835–855, 2002;
- [50] Merck KGaA, “*Identification of matrix effects by means of standard addition*”, *Application*, 2014
- <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/349/994/interferences-spiking-2014.pdf> (acedido a Set. 13, 2023)
- [51] Andersen, J. (2017) The Standard addition method revisited. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. vol. 89, 21-33;
- [52] Burns, D.T., Walker, M.J. Origins of the method of standard additions and of the use of an internal standard in quantitative instrumental chemical analyses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 411, 2749–2753 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01754-w>
- [53] J. Jurado, «Some practical considerations for linearity assessment of calibration curves as function of concentration levels according to the fitness-for-purpose approach», *Talanta*, vol. 172, pp. 221-229, Set. 2017, doi: 10.1016/j.talanta.2017.05.049
- [54] «ISO 8466-1: Water quality — Calibration and evaluation of analytical methods — Part 1: Linear calibration function». *International Organization for Standardization* (ISO), 1990.
- [55] P. Araujo, «Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation», *Journal of Chromatography*, vol. 877, n. 23, pp. 2224–2234, Ago. 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2008.09.030
- [56] C. Augusto e L. Cabrita, «Guia Relacre 13: Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química», 2000

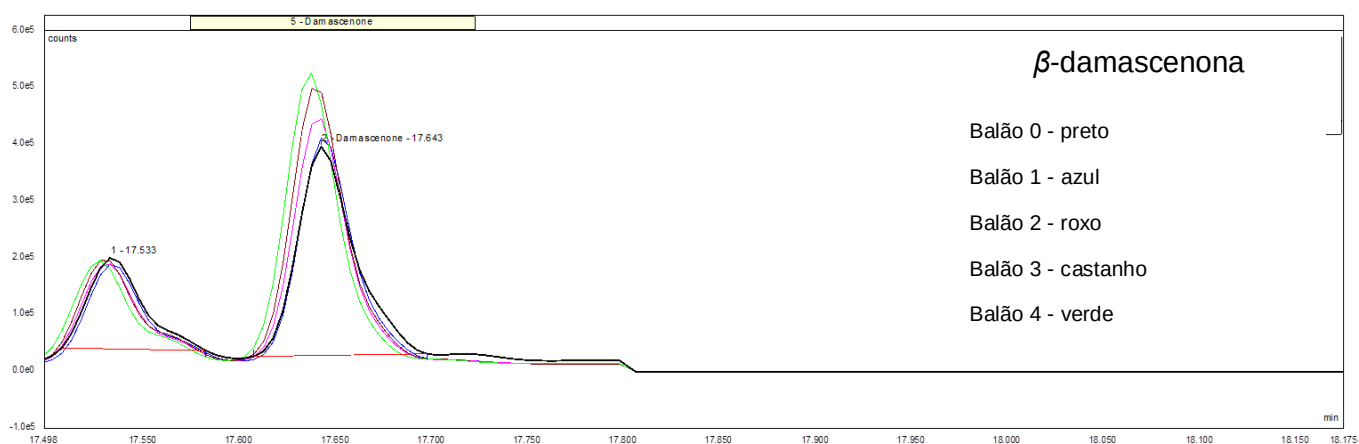
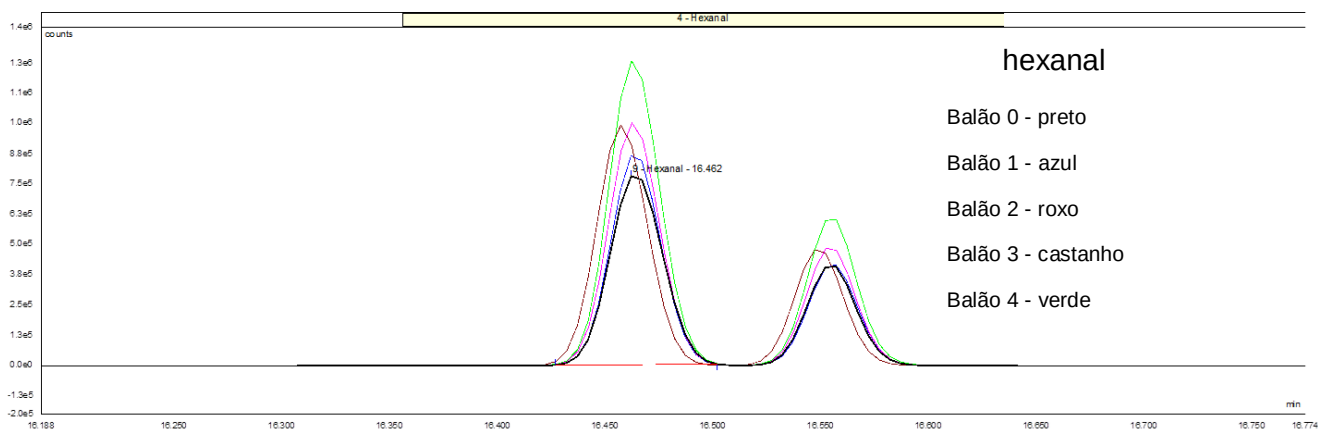
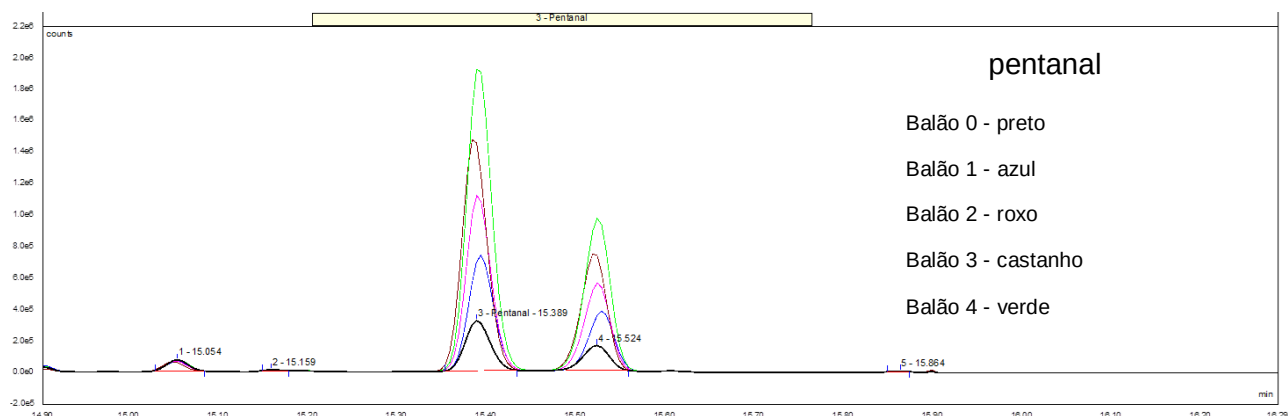
- [57] A. Shrivastava e V. B. Gupta, «Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods», *Chronicles of Young Scientists*, vol. 2, n. 1, pp. 21–25, 2011, doi: 10.4103/2229-5186.79345.
- [58] USP Signal-to-Noise in Empower 2 (*Waters*).
https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/tecn10123052_01.pdf (acedido a Set. 14, 2023)
- [59] Da Silva FR, Gonçalves-Souza T, Paterno GB, Provete DB, Vancine MH. (2022) Análises ecológicas no R. Nupeea : Recife, PE, Canal 6 : São Paulo. 640 p. ISBN 978-85-7917-564-0
- [60] Margaux Simon, Gaël Vuylsteke & Sonia Collin (2022) Flavor Defects of Fresh and Aged NABLABs: New Challenges Against Oxidation, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, DOI: 10.1080/03610470.2022.2142756
- [61] Moreira, Nathalie & Meireles, Sónia & Brandão, Tiago & Guedes de Pinho, Paula. (2013). Optimization of the HS-SPME-GC-IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers. *Talanta*. 117C. 523-531. 10.1016/j.talanta.2013.09.027
- [62] Alvim, R. P. R., de Cássia Oliveira Gomes, F., Garcia, C. F., de Lourdes Almeida Vieira, M., and de Resende Machado, A. M. (2017) Identification of volatile organic compounds extracted by headspace solid-phase microextraction in specialty beers produced in Brazil. *Journal of the Institute of Brewing*, 123: 219–225. doi: 10.1002/jib.416.
- [63] Nobis, A.; Kwasnicki, M.; Lehnhardt, F.; Hellwig, M.; Henle, T.; Becker, T.; Gastl, M. A Comprehensive Evaluation of Flavor Instability of Beer (Part 2): The Influence of *De Novo* Formation of Aging Aldehydes. *Foods* 2021, 10, 2668. <https://doi.org/10.3390/foods10112668>
- [64] Carneiro, J.R., Guido, L.F., Almeida, P.J., Rodrigues, J.A. and Barros, A.A. (2006), The impact of sulphur dioxide and oxygen on the behaviour of 2-furaldehyde in beer: an industrial approach. *International Journal of Food Science & Technology*, 41: 545-552. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01104.x>
- [65] Currie, B. R., Kulandai, J., FitzRoy, M. D., Hawthorne, D. B., & Kavanagh, T. E. (1990). Processing influences on the stability of packaged beer. *In Proc. Conv. Inst. Brew* (Vol. 21, pp. 117-125)

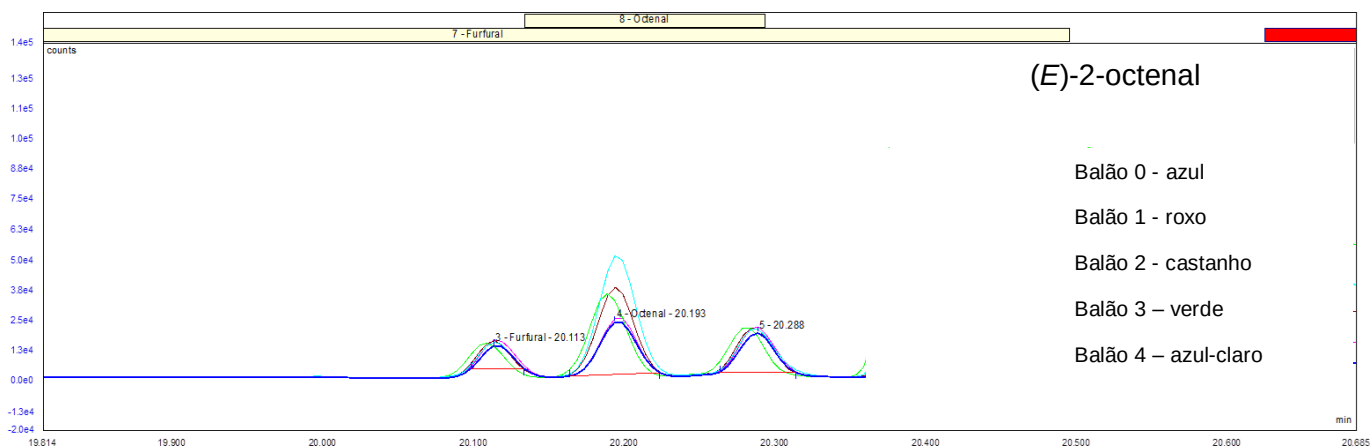
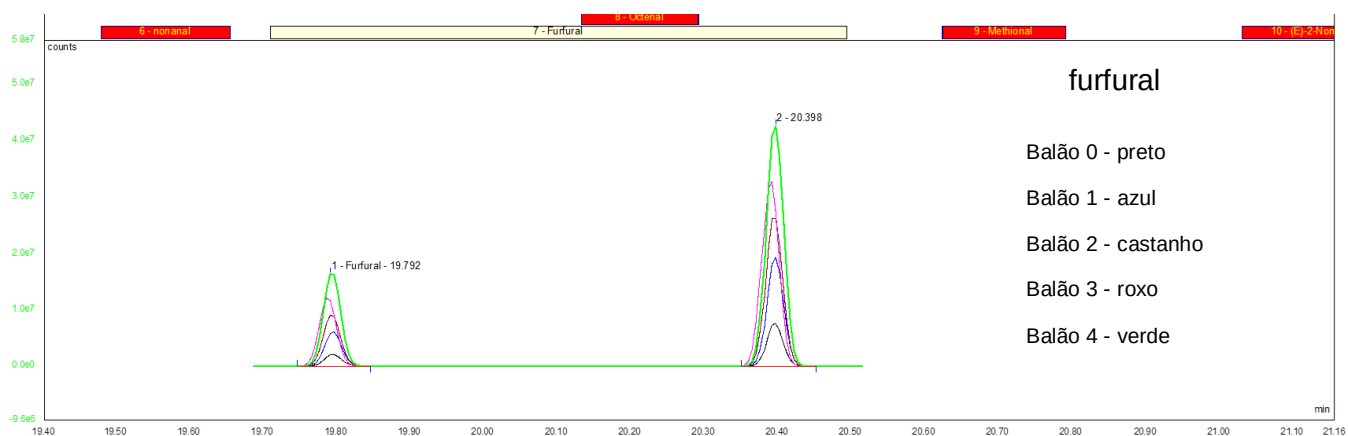
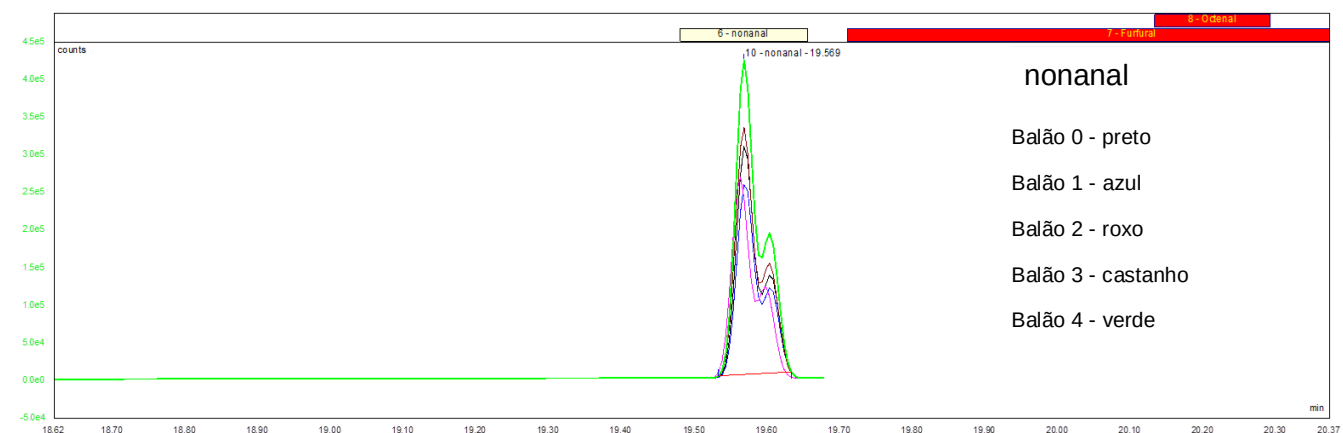
- [66] Engewald, W., Dettmer-Wilde, K. (2014). Theory of Gas Chromatography. In: Dettmer-Wilde, K., Engewald, W. (eds) *Practical Gas Chromatography*. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54640-2_2
- [67] Bao, Mingliang & Joza, Peter & Masters, Andrew & Rickert, William. (2014). Analysis of Selected Carbonyl Compounds in Tobacco Samples by Using Pentafluorobenzylhydroxylamine Derivatization and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Beiträge zur Tabakforschung / Contributions to Tobacco Research*. 26. 10.2478/cttr-2014-0012.

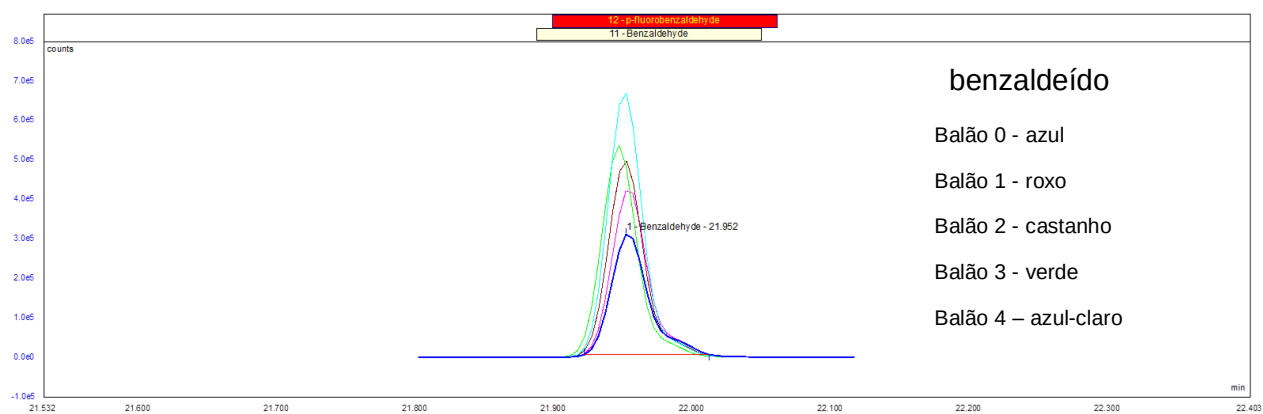
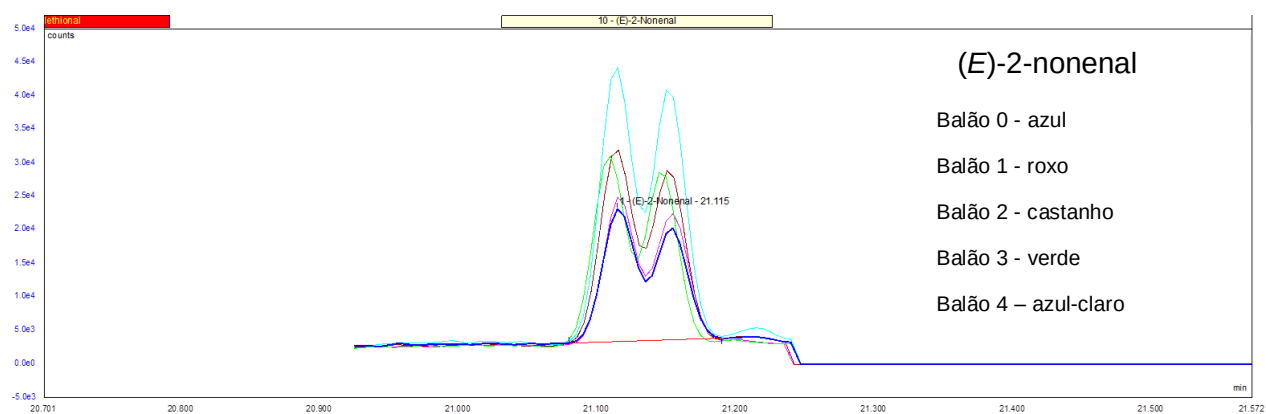
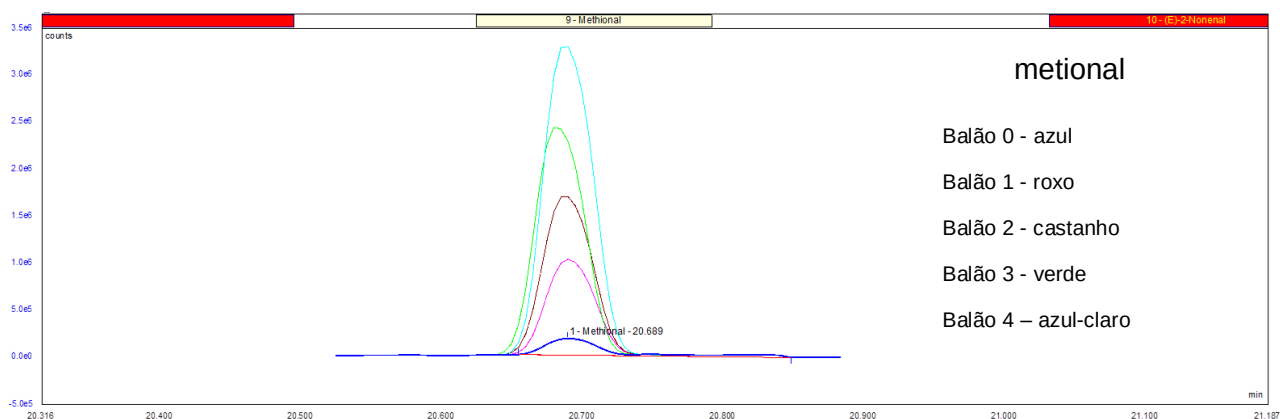
Anexo 1

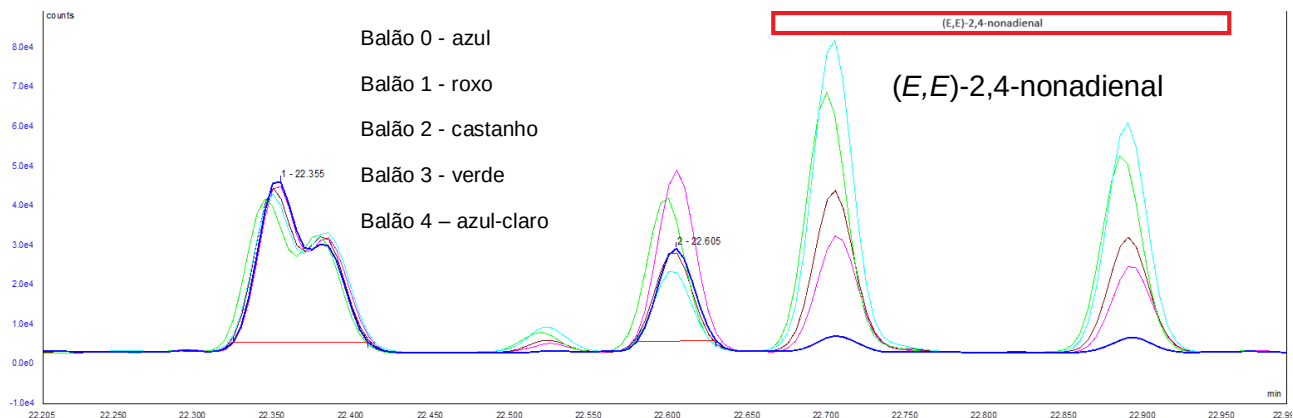
Cromatogramas referentes aos compostos utilizados no método:



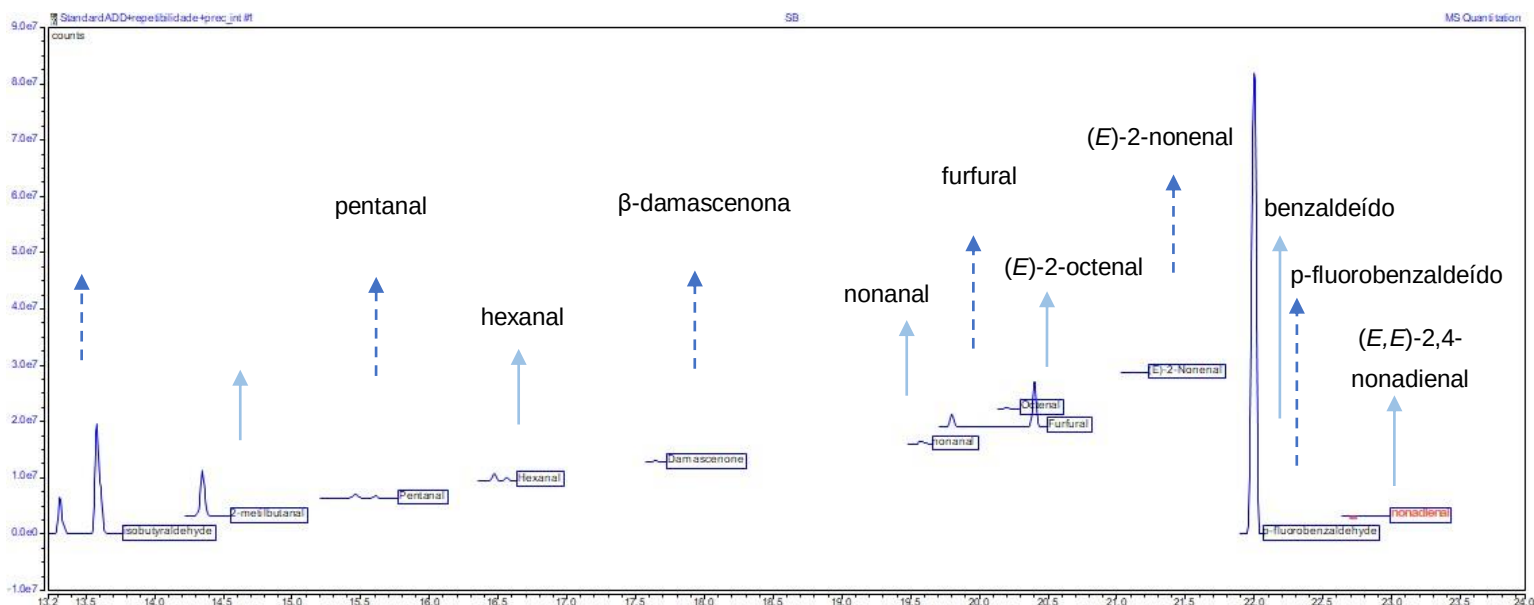








Cromatograma com totalidade de sinais correspondente ao balão sem adição de padrão (Balão 0)



Anexo 2

Conjuntos de tabelas referentes ao cálculo da homogeneidade de variâncias.

**2-metilbutanal
(A/A_{pi})**

Ensaio	1º ponto	4º ponto
1	0,16	0,44
2	0,16	0,39
3	0,17	0,41
4	0,21	0,44
5	0,21	0,35
6	0,17	0,47
7	0,21	0,52
8	0,22	0,42
9	0,21	0,46
10	0,26	0,57
Média	0,20	0,45
s ²	0,0010	0,0039
F _{exp}	4,03	
F _{tab} (0,01;9;9)	5,35	

pentanal (A/A_{pi})

Ensaio	1º ponto	4º ponto
1	0,014	0,078
2	0,015	0,070
3	0,016	0,071
4	0,020	0,077
5	0,020	0,064
6	0,016	0,078
7	0,019	0,071
8	0,019	0,067
9	0,019	0,074
10	0,022	0,068
Média	0,018	0,072
s ²	6,67 x 10 ⁻⁶	2,39 x 10 ⁻⁵
F _{exp}	3,59	
F _{tab} (0,01;9;9)	5,35	

hexanal (A/A_{pi})

Ensaio	1º ponto	4º ponto
1	0,014	0,054
2	0,019	0,050
3	0,021	0,050
4	0,029	0,055
5	0,028	0,037
6	0,022	0,056
7	0,026	0,060
8	0,027	0,049
9	0,028	0,058
10	0,045	0,076
Média	0,026	0,055
s ²	6,79 x 10 ⁻⁵	0,00010
F _{exp}	1,50	
F _{tab} (0,01;9;9)	5,35	

β-damascenona (A/A_{pi})

Ensaio	1º ponto	4º ponto
1	0,005	0,012
2	0,005	0,011
3	0,006	0,012
4	0,007	0,012
5	0,008	0,012
6	0,006	0,012
7	0,007	0,013
8	0,008	0,011
9	0,007	0,013
10	0,013	0,017
Média	0,007	0,012
s ²	4,75 x 10 ⁻⁶	2,99 x 10 ⁻⁶
F _{exp}	0,63	
F _{tab} (0,01;9;9)	5,35	

**nonanal
(A/A_{pi})**

Ensaio	1º ponto	4º ponto
1	0,008	0,029
2	0,007	0,017
3	0,006	0,012
4	0,011	0,016
5	0,010	0,013
6	0,010	0,015
7	0,008	0,014
8	0,007	0,013
9	0,008	0,015
10	0,008	0,015
Média	0,008	0,016
s ²	2,27 x 10 ⁻⁶	2,20 x 10 ⁻⁵
F _{exp}	9,71	
F _{tab} (0,01;9;9)	5,35	

**furfural
(A/A_{pi})**

Ensaio	1º ponto	4º ponto
1	0,30	1,28
2	0,29	1,20
3	0,34	1,33
4	0,40	1,33
5	0,42	1,31
6	0,32	1,34
7	0,37	1,38
8	0,41	1,25
9	0,39	1,41
10	1,12	1,87
Média	0,44	1,37
s ²	0,060	0,035
F _{exp}	0,58	
F _{tab} (0,01;9;9)	5,35	

**(E)-2-octenal
(A/A_{pi})**

Ensaio	1º ponto	4º ponto
1	0,00029	0,00080
2	0,00020	0,00080
3	0,00031	0,00070
4	0,00045	0,00089
5	0,00045	0,00094
6	0,00031	0,00090
7	0,00038	0,00082
8	0,00031	0,00084
9	0,00038	0,00088
10	0,00012	0,00100
Média	0,00032	0,00086
s ²	1,09 x 10 ⁻⁸	7,39 x 10 ⁻⁹
F _{exp}	1,47	
F _{tab} (0,01;9;9)	5,35	

metional (A/A_{pi})

Ensaio	1º ponto	4º ponto
1	0,018	0,100
2	0,017	0,095
3	0,020	0,110
4	0,024	0,107
5	0,025	0,106
6	0,019	0,109
7	0,022	0,108
8	0,025	0,102
9	0,024	0,117
10	0,026	0,117
Média	0,022	0,107
s ²	9,94 x 10 ⁻⁶	4,73 x 10 ⁻⁵
F _{exp}	4,76	
F _{tab} (0,01;9;9)	5,35	

**(E)-2-nonenal
(A/A_{pi})**

Ensaio	1º ponto	4º ponto
1	0,00029	0,00120
2	0,00028	0,00107
3	0,00039	0,00117
4	0,00052	0,00112
5	0,00042	0,00122
6	0,00030	0,00135
7	0,00033	0,00114
8	0,00036	0,00114
9	0,00044	0,00112
10	0,00042	0,00133
Média	0,00037	0,00119
s ²	6,15 x 10 ⁻⁹	8,47 x 10 ⁻⁹
F _{exp}	1,38	
F _{tab} (0,01;9;9)	5,35	

**benzaldeído
(A/A_{pi})**

Ensaio	1º ponto	4º ponto
1	0,0059	0,0154
2	0,0059	0,0144
3	0,0064	0,0156
4	0,0073	0,0160
5	0,0076	0,0166
6	0,0062	0,0160
7	0,0070	0,0163
8	0,0076	0,0154
9	0,0071	0,0167
10	0,0084	0,0185
Média	0,0070	0,0161
s ²	6,89 x 10 ⁻⁷	1,20 x 10 ⁻⁶
F _{exp}	1,74	
F _{tab} (0,01;9;9)	5,35	

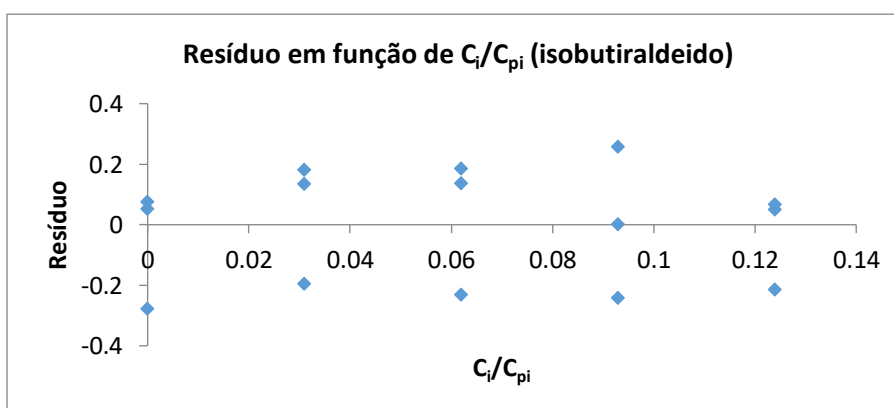
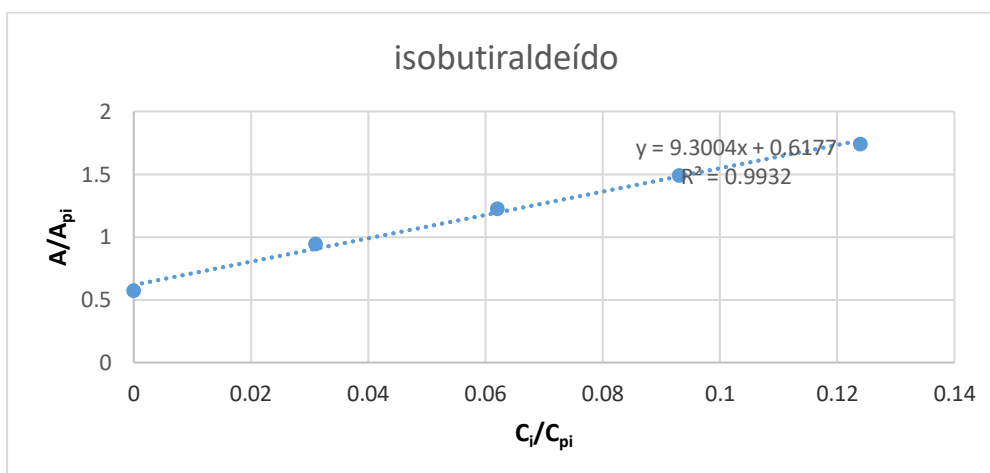
**(E,E)-2,4-nonadienal
(A/A_{pi})**

Ensaio	1º ponto	4º ponto
1	0,00050	0,00341
2	0,00057	0,00261
3	0,00056	0,00353
4	0,00069	0,00369
5	0,00077	0,00312
6	0,00042	0,00317
7	0,00058	0,00331
8	0,00067	0,00311
9	0,00058	0,00306
10	0,00057	0,00370
Média	0,00059	0,00327
s ²	9,56 x 10 ⁻⁹	1,09 x 10 ⁻⁷
F _{exp}	11,44	
F _{tab} (0,01;9;9)	5,35	

Anexo 3

Este anexo contém, respetivamente: tabela referente aos dados utilizados na curva de calibração; gráfico da curva de calibração; gráfico do resíduo em função de C_i/C_{pi} ; parâmetros utilizados para o teste de Mandel.

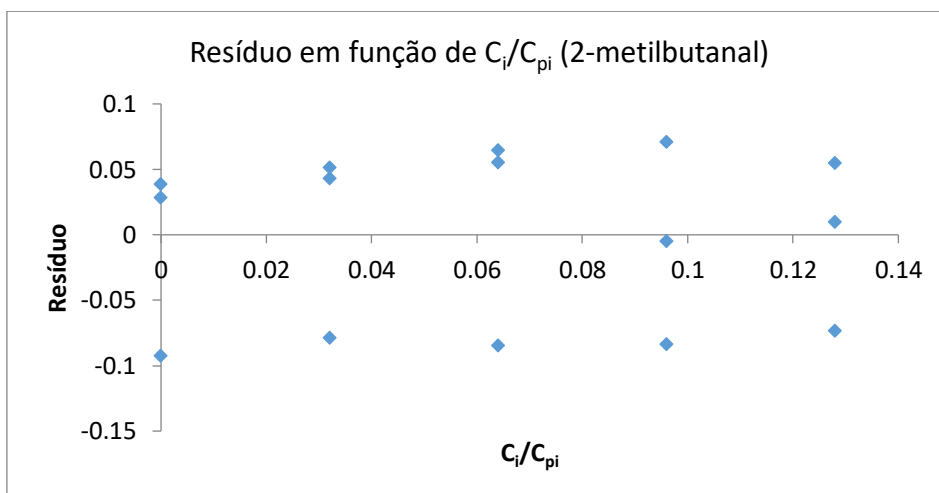
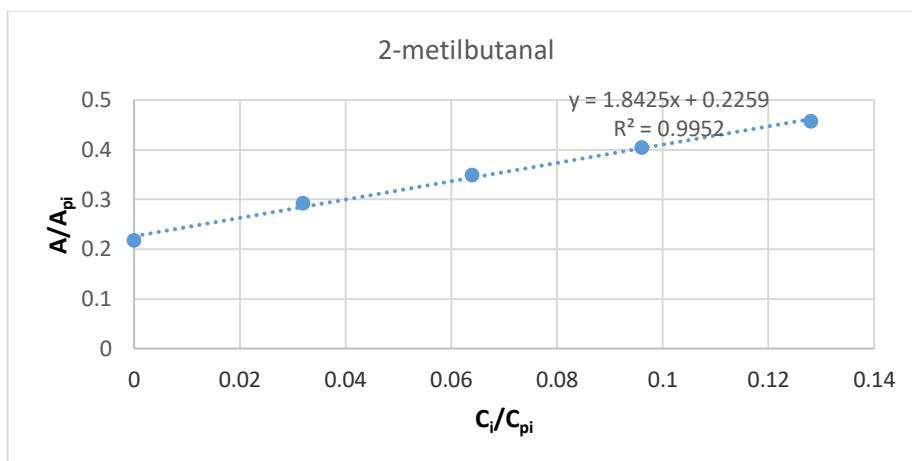
isobutiraldeído			
C_{pi} (μg/L)	C_i (μg/L)	C_i/C_{pi}	A/A_{pi}
100	0	0	0,6
100	3,1	0,031	0,9
100	6,2	0,062	1,2
100	9,3	0,093	1,5
100	12,4	0,124	1,7



$S_{y/x(1)}$	$1,88 \times 10^{-3}$
$S_{y/x(2)}$	$4,45 \times 10^{-4}$
DS^2	$4,76 \times 10^{-3}$
VT	10,7
$F_{tab}(0,01;1;5-3)$	98,5

2-metilbutanal

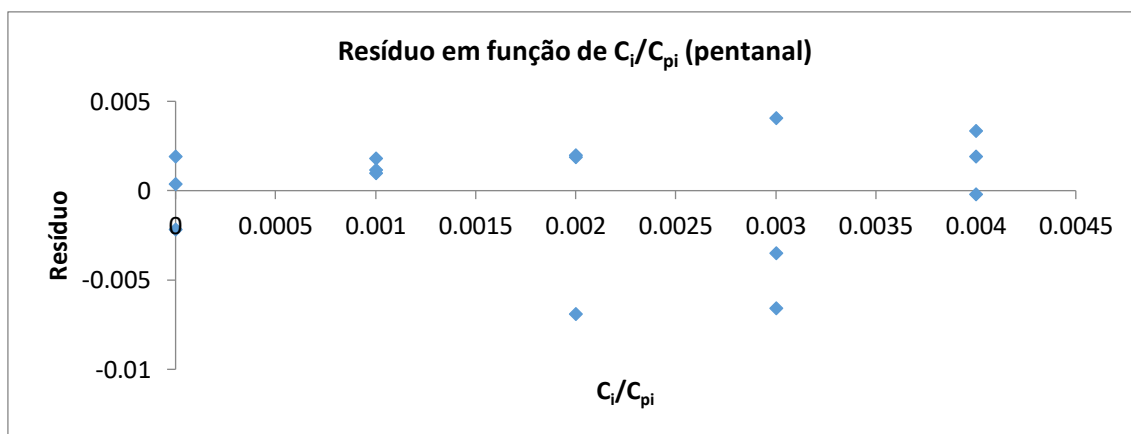
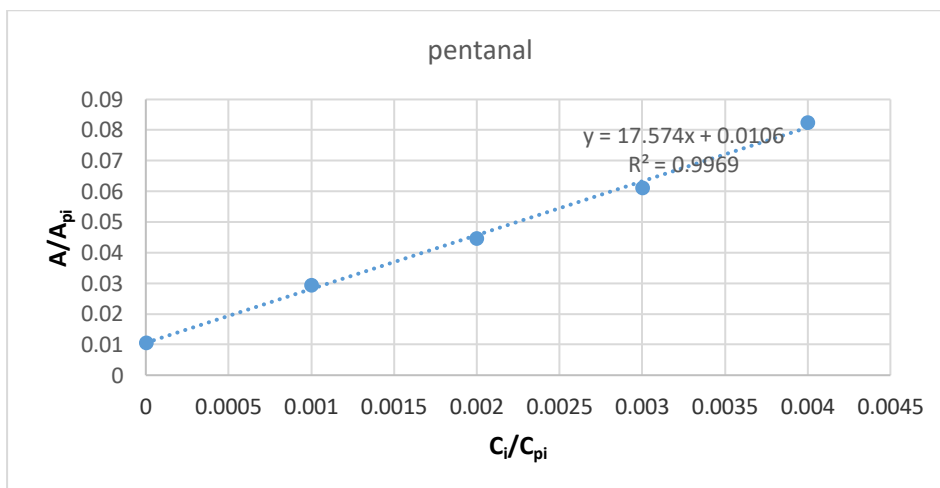
C_{pi} (µg/L)	C_i (µg/L)	C_i/C_{pi}	A/A_{pi}
100	0	0	0,2
100	3,2	0,032	0,3
100	6,4	0,064	0,3
100	9,6	0,096	0,4
100	12,8	0,128	0,5



$S_{y/x(1)}$	$5,62 \times 10^{-5}$
$S_{y/x(2)}$	$1,68 \times 10^{-5}$
DS^2	$1,35 \times 10^{-4}$
VT	8,05
$F_{tab}(0,01;1;5-3)$	98,5

pentanal

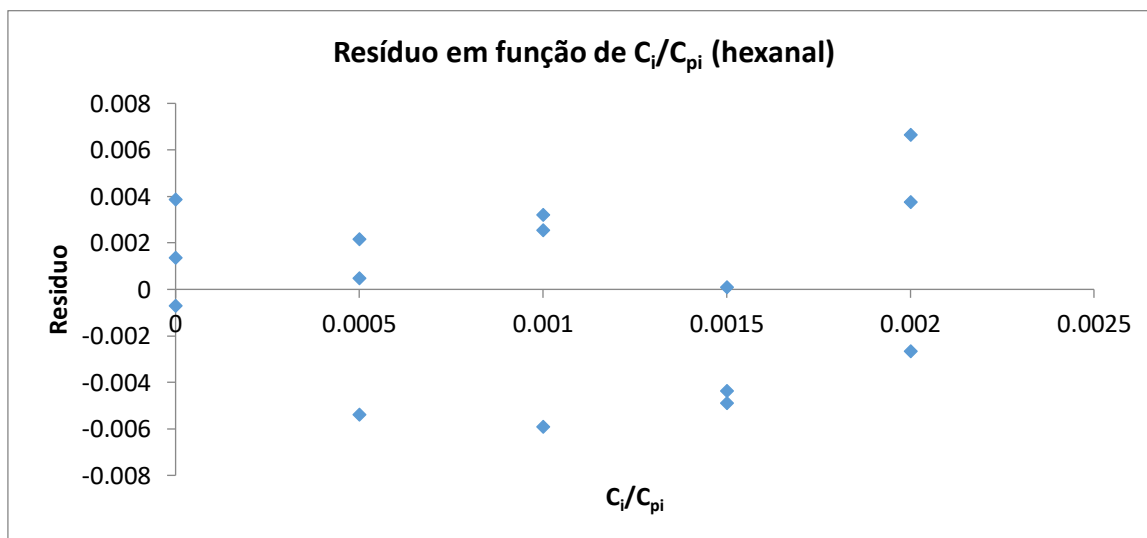
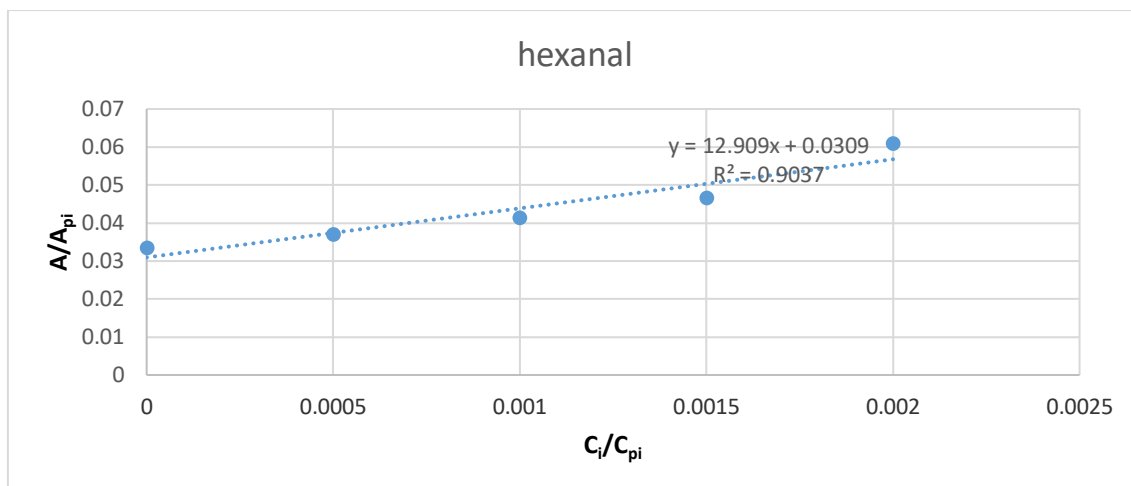
C_{pi} (µg/L)	C_i (µg/L)	C_i/C_{pi}	A/A_{pi}
100	0	0	0,011
100	0,1	0,001	0,029
100	0,2	0,002	0,045
100	0,3	0,003	0,061
100	0,4	0,004	0,083



$S_{y/x(1)}$	$3,2 \times 10^{-6}$
$S_{y/x(2)}$	$3,5 \times 10^{-6}$
DS^2	$2,7 \times 10^{-6}$
VT	0,77
$F_{tab}(0,01;1;5-3)$	98,5

hexanal

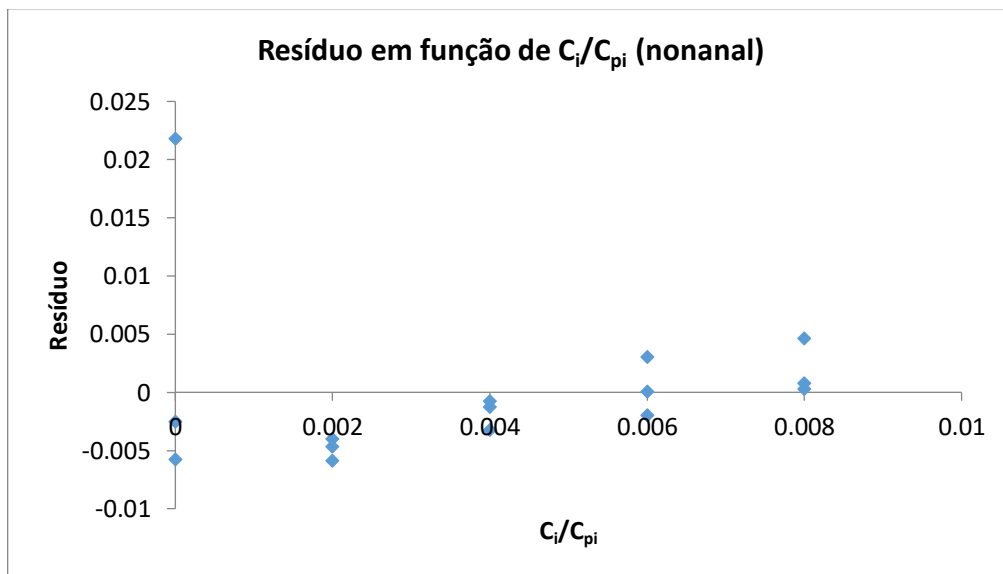
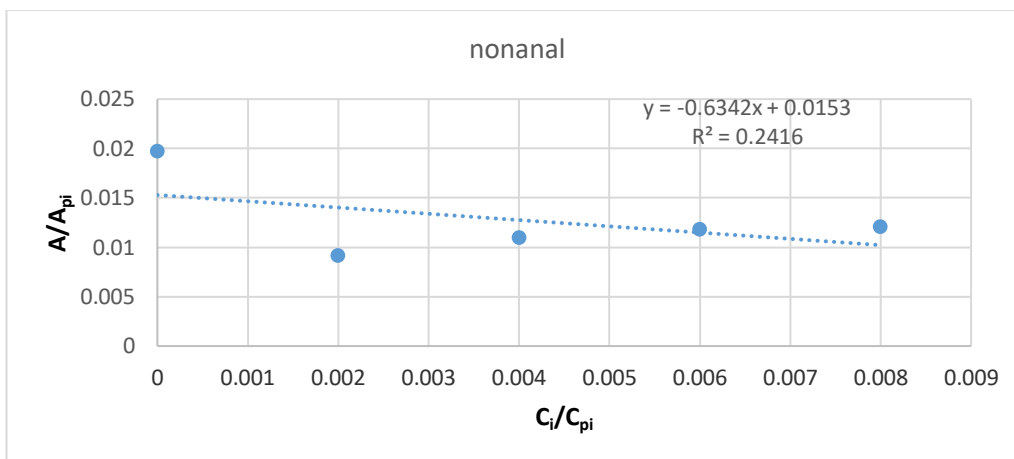
C_{pi} ($\mu\text{g/L}$)	C_i ($\mu\text{g/L}$)	C_i/C_{pi}	A/A_{pi}
100	0	0	0,033
100	0,05	0,00050	0,037
100	0,1	0,0010	0,041
100	0,15	0,0015	0,047
100	0,2	0,0020	0,061



$S_{y/x(1)}$	$1,5 \times 10^{-5}$
$S_{y/x(2)}$	$4,8 \times 10^{-5}$
DS^2	$-5,1 \times 10^{-5}$
VT	-1,07
$F_{tab}(0,01;1;5-3)$	98,5

nonanal

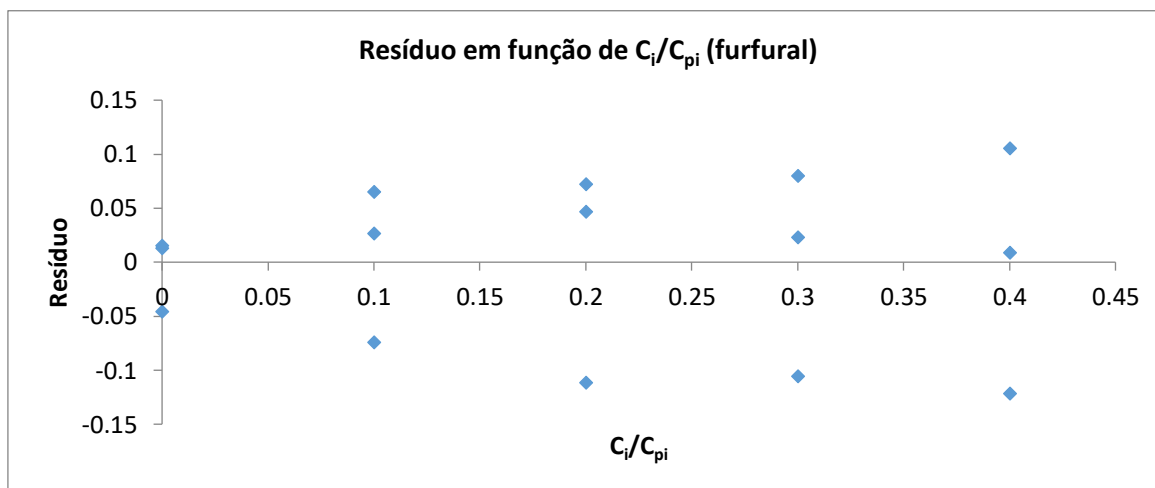
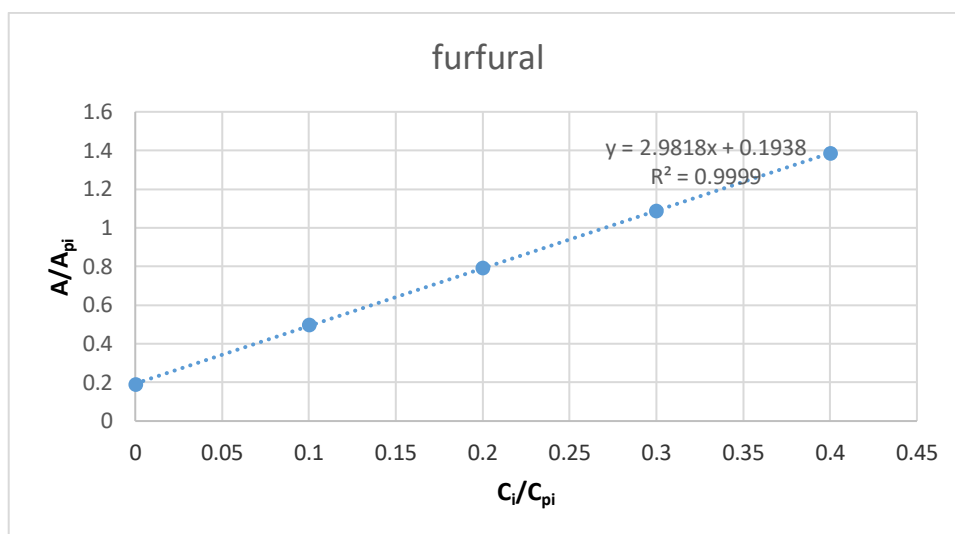
C_{pi} (µg/L)	C_i (µg/L)	C_i/C_{pi}	A/A_{pi}
100	0	0	0,020
100	0,2	0,002	0,009
100	0,4	0,004	0,011
100	0,6	0,006	0,012
100	0,8	0,008	0,012



$S_{y/x(1)}$	$1,7 \times 10^{-5}$
$S_{y/x(2)}$	$3,1 \times 10^{-3}$
DS^2	$-6,2 \times 10^{-3}$
VT	-1,98
$F_{tab}(0,01;1;5-3)$	98,5

furfural

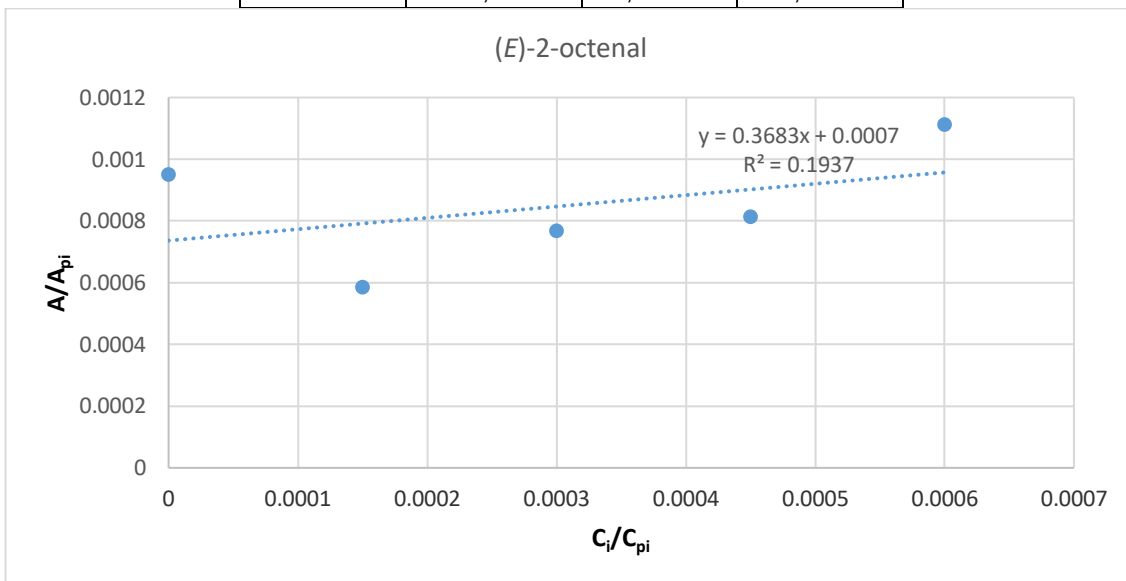
C_{pi} ($\mu\text{g/L}$)	C_i ($\mu\text{g/L}$)	C_i/C_{pi}	A/A_{pi}
100	0	0	0,19
100	10	0,1	0,50
100	20	0,2	0,79
100	30	0,3	1,09
100	40	0,4	1,38



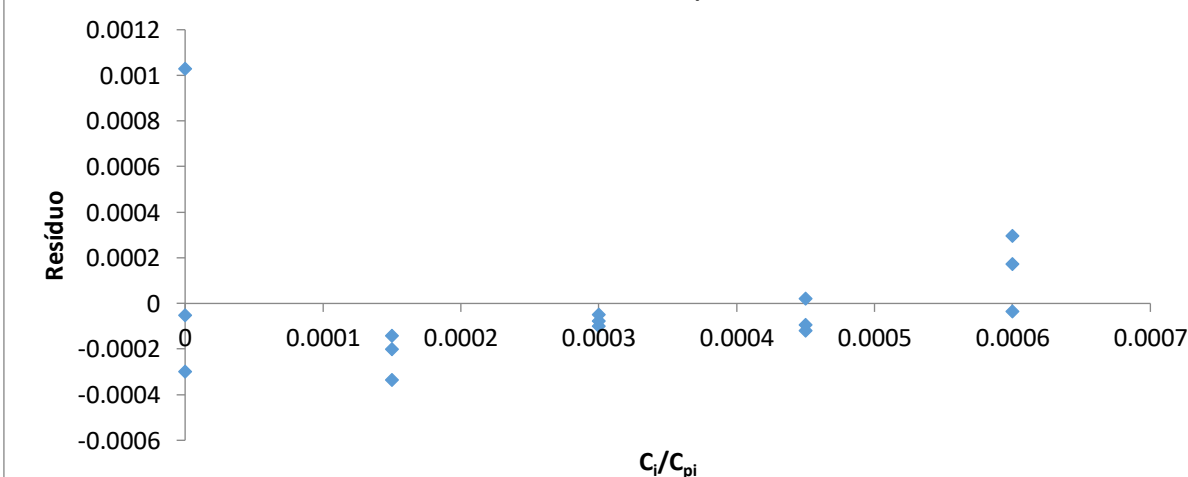
$S_{y/x(1)}$	$2,6 \times 10^{-5}$
$S_{y/x(2)}$	$1,5 \times 10^{-5}$
DS^2	$4,8 \times 10^{-5}$
VT	3,11
$F_{tab}(0,01;1;5-3)$	98,5

(E)-2-octenal

C_{pi} (µg/L)	C_i (µg/L)	C_i/C_{pi}	A/A_{pi}
100	0	0	0,00095
100	0,015	0,00015	0,00059
100	0,03	0,00030	0,00077
100	0,045	0,00045	0,00082
100	0,06	0,00060	0,0011



Resíduo em função de C_i/C_{pi} ((E)-2-octenal)

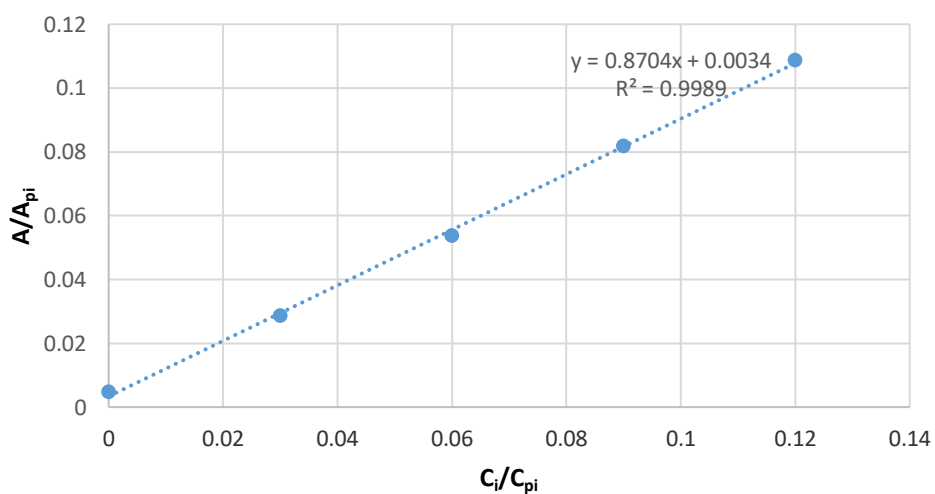


$S_{y/x(1)}$	$4,2 \times 10^{-8}$
$S_{y/x(2)}$	$3,5 \times 10^{-8}$
DS^2	$5,7 \times 10^{-8}$
VT	1,62
$F_{tab}(0,01;1;5-3)$	98,5

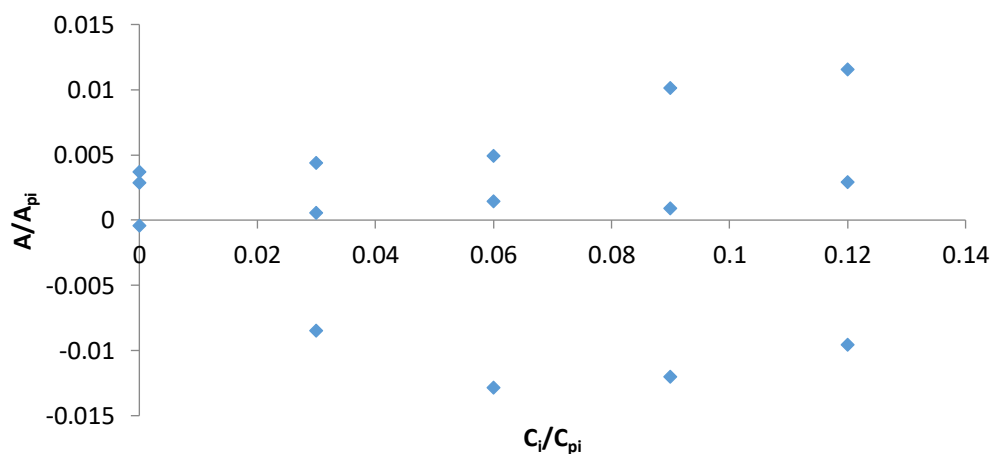
metional

C_{pi} (µg/L)	C_i (µg/L)	C_i/C_{pi}	A/A_{pi}
100	0	0	0,00487
100	3	0,030	0,0286
100	6	0,060	0,0538
100	9	0,090	0,0819
100	12	0,12	0,109

metional



Resíduo em função de C_i/C_{pi} (metional)

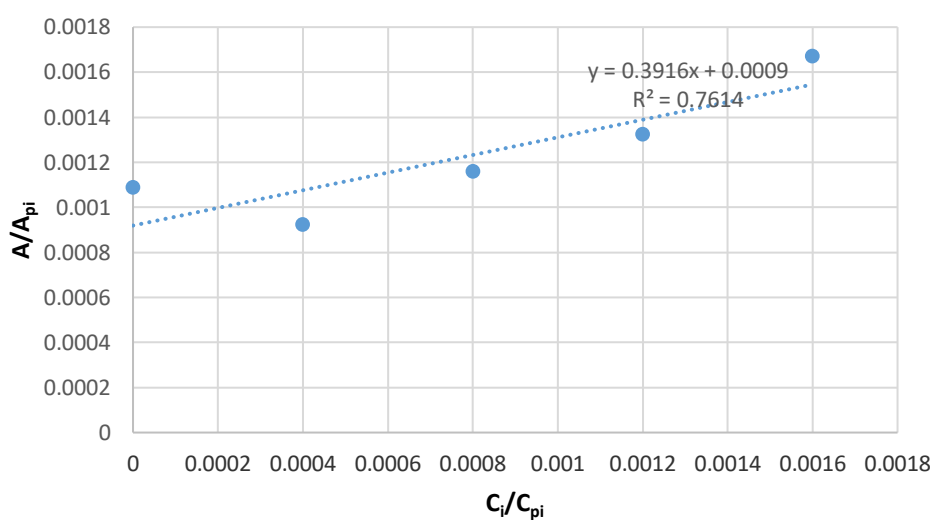


$S_{y/x(1)}$	$2,4 \times 10^{-6}$
$S_{y/x(2)}$	$3,1 \times 10^{-5}$
DS^2	$-5,4 \times 10^{-5}$
VT	-1,76
$F_{tab}(0,01;1;5-3)$	98,5

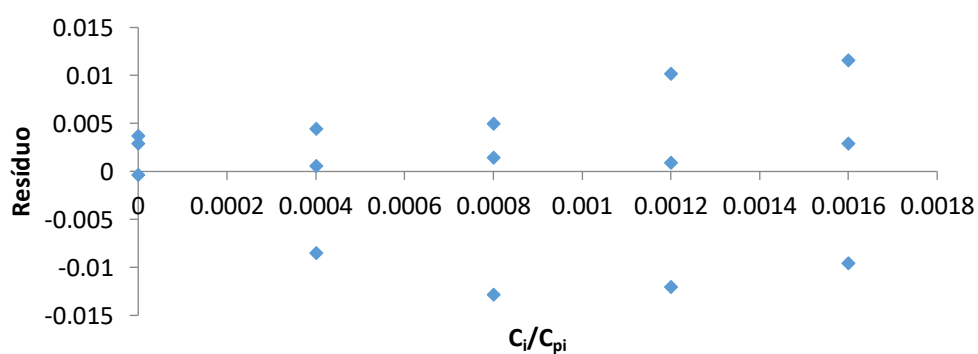
(E)-2-nonenal

C_{pi} (μg/L)	C_i (μg/L)	C_i/C_{pi}	A/A_{pi}
100	0	0	0,00109
100	0,04	0,00040	0,000920
100	0,08	0,00080	0,00116
100	0,12	0,0012	0,00132
100	0,16	0,0016	0,00167

(E)-2-nonenal



Resíduo em função de C_i/C_{pi} ((E)-2-nonenal)

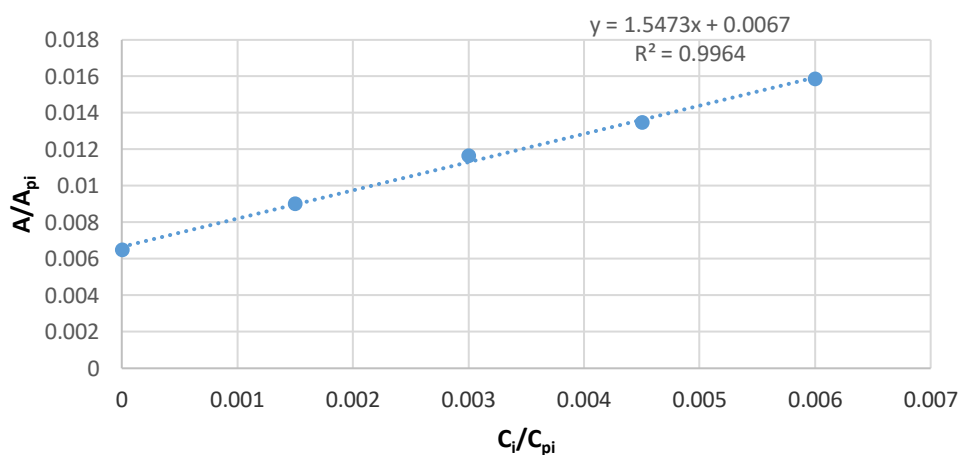


$S_{y/x(1)}$	$2,6 \times 10^{-8}$
$S_{y/x(2)}$	$5,7 \times 10^{-8}$
DS^2	$-3,7 \times 10^{-8}$
VT	-0,652
$F_{tab}(0,01;1;5-3)$	98,5

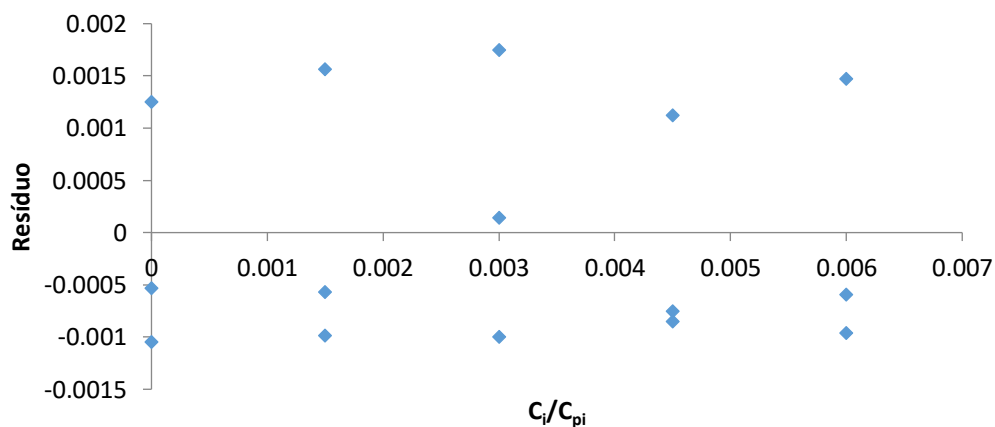
benzaldeído

C_{pi} (µg/L)	C_i (µg/L)	C_i/C_{pi}	A/A_{pi}
100	0	0	0,0065
100	0,15	0,0015	0,0090
100	0,3	0,0030	0,0117
100	0,45	0,0045	0,0135
100	0,6	0,0060	0,0159

benzaldeído



Resíduo em função de C_i/C_{pi} (benzaldeído)

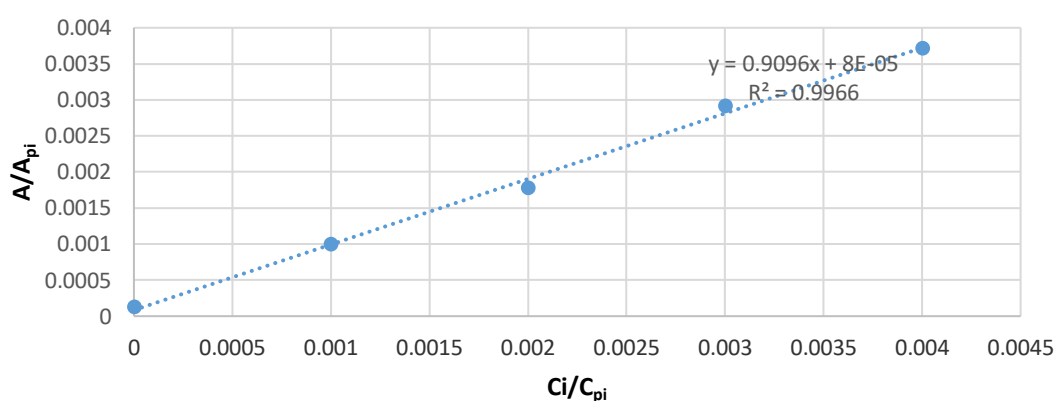


$S_{y/x(1)}$	$6,4 \times 10^{-8}$
$S_{y/x(2)}$	$2,4 \times 10^{-6}$
DS^2	$-4,5 \times 10^{-6}$
VT	-1,92
$F_{tab}(0,01;1;5-3)$	98,5

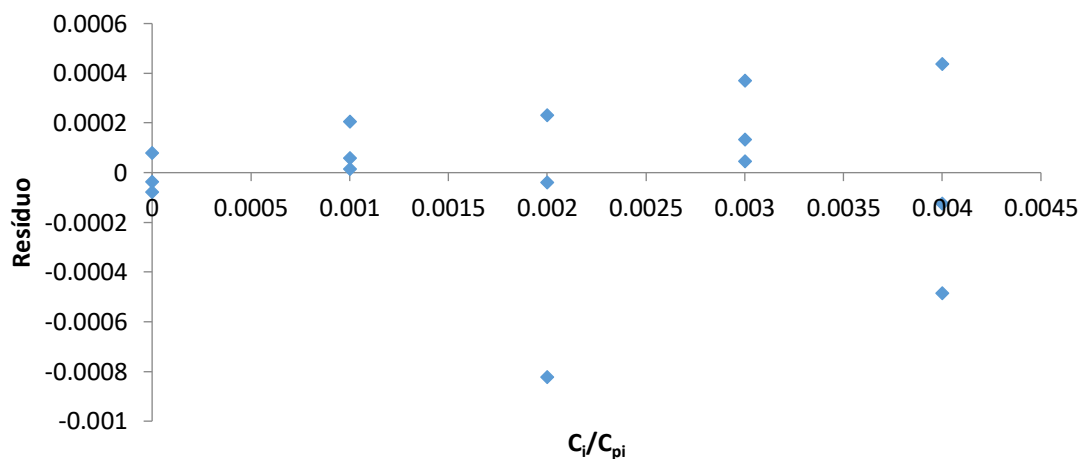
(*E,E*)-2,4-nonadienal

C_{pi} (µg/L)	C_i (µg/L)	C_i/C_{pi}	A/A_{pi}
100	0	0	0,00012
100	0,1	0,001	0,0010
100	0,2	0,002	0,0018
100	0,3	0,003	0,0029
100	0,4	0,004	0,0037

(*E,E*)-2,4-nonadienal



Resíduo em função de C_i/C_{pi} ((*E,E*)-2,4-nonadienal)



$S_{y/x(1)}$	$9,4 \times 10^{-9}$
$S_{y/x(2)}$	$1,5 \times 10^{-8}$
DS^2	$-9,8 \times 10^{-10}$
VT	-0,07
$F_{tab}(0,01;1;5-3)$	98,5

Anexo 4

O teste de Grubbs é utilizado em situações de suspeição de valores, na possibilidade de eles serem *outliers*. Portanto, o seu procedimento cálculo é feito através de:

$$G_{exp} = \frac{|x - \bar{x}|}{s}$$

Neste cálculo, x será o valor suspeito, $\bar{x}$ será a média do conjunto de dados e s o desvio padrão. O valor de G teórico será $G_{crítico}(0,01;10-2)=2,41$.

	pentanal	nonanal	(E)-2-nonenal
x	0,70	0,028	0,0013
$\bar{x}$	0,035	0,018	0,00086
s	0,012	0,0043	0,00017
G_{exp}	2,81	2,45	2,30
$G_{crítico}$	2,41		

Visto que o pentanal e o nonanal apresentam valores de $G_{exp} > G_{crítico}$, isto indica que ambos os valores suspeitos podem ser considerados *outliers*, pelo que deverá ser necessário retirar o dado valor no cálculo para a média e desvio padrão dos ensaios. No caso do (E)-2-nonenal, $G_{exp} < G_{crítico}$, pelo que não será considerado um *outlier*.