**Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos**

**Determinação de Humulonas e Lupulonas em Lúpulo por
Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca e
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Orientador: Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior

Orientado: Lucas Mari Silva

São Carlos, 2020

Lucas Mari Silva

**Determinação de Humulonas e Lupulonas em Lúpulo por
Microextração em Fase Líquida com Fibra Oca e
Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos da Universidade de
São Paulo como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior

São Carlos, 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e familiares por todo apoio e suporte em cada uma das etapas da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior pela orientação neste trabalho de mestrado e por todo aprendizado adquirido durante este período.

De forma geral, a todos os Professores do Instituto de Química de São Carlos, pelos ensinamentos e pela disponibilização da infraestrutura laboratorial necessária a realização desta pesquisa. Em especial ao Prof. Dr. Álvaro José dos Santos Neto que gentilmente cedeu as fibras de polipropileno utilizadas neste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (processo nº165217/2017-0) pela bolsa de mestrado fornecida.

Aos meus colegas de laboratório e amigos pelas discussões calorosas, por todo aprendizado, os finais de semana no laboratório, as risadas e os momentos de descontração sem os quais tudo seria muito mais difícil.

A minha companheira Fabrícia Heloisa por todo apoio e paciência, pelos planos e sonhos compartilhados, pelo suporte nos momentos mais difíceis e por dividir comigo este momento tão importante.

RESUMO

O lúpulo (*Humulus Lupulus* Linnaeus) apresenta resinas amargas ricas em humulonas e lupulonas (α -ácidos e β -ácidos, respectivamente), que são compostos responsáveis pelo amargor, pelo equilíbrio do sabor e pela sensação de saciedade que a cerveja proporciona. Desta forma, a quantificação de humulonas e lupulonas em lúpulo é fundamental para se estabelecer o preço de comercialização do lúpulo e para se escolher e calcular a quantidade correta de lúpulo que será utilizado em uma receita cervejeira. As metodologias oficiais para quantificação de humulonas e lupulonas em lúpulo utilizam preparo de amostras baseado em extração com solventes orgânicos como éter dietílico, metanol, tolueno ou iso-octano; seguido de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Em função disso, em uma análise de humulonas e lupulonas em lúpulo são gerados cerca de 120 mL de resíduos de solventes para cada replicata de extração. O objetivo geral desta pesquisa foi desenvolver, otimizar e validar uma metodologia analítica de preparo de amostras miniaturizada, empregando microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME) e HPLC para determinação de humulonas e lupulonas em lúpulo. Para isso, foi realizado um planejamento experimental baseado em superfície de resposta que permitiu conhecer as melhores condições para a extração das humulonas e lupulonas em lúpulo (isto é, 20 μ L de ciclohexano como solvente de extração, tempo de extração de 32 minutos, agitação de 700 rpm, pH 7 e 0,025 g de NaCl). A metodologia desenvolvida foi avaliada segundo os requisitos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária estabelecidos na RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. O método mostrou resultados adequados de linearidade e precisão para a análise de humulonas, mas não para lupulonas. Os resultados de linearidade para as humulonas revelaram um coeficiente de determinação $\geq 0,999$; a recuperação foi de 79,7 a 100,7%; os limites de detecção para cohumulona e N+adhumulona foram de 0,09 a 0,25% (m/m), enquanto que os limites de quantificação para estes mesmos compostos foram de 0,31 - 0,83 % (m/m). O novo método desenvolvido para análise de humulonas em lúpulo promoveu uma redução de mais de seis mil vezes na quantidade de solvente orgânico empregado na etapa de preparo das amostras.

Palavras chave: preparo de amostras, HF-LPME, humulonas, cromatografia líquida de alta eficiência, validação.

ABSTRACT

Hops (*Humulus Lupulus* Linnaeus) have bitter resins rich in humulones and lupulones (α -acids and β -acids, respectively), which are responsible for the bitterness, taste balance and satiety of beer. Therefore, quantification of hops is essential for establishing the hops marketing price, choosing and calculating the correct amount of hops to use in a brewing recipe, and maintaining the flavor quality standard between different brewing lots. Official methodologies for quantifying humulones and lupulones in hops using high-performance liquid chromatography (HPLC) after sample preparation by solid-liquid extraction using solvents such as diethyl ether, methanol, toluene or isooctane. As a result, in an analysis of humulones and lupulones in hops, approximately 120 mL of solvent residues are generated for each extraction replicate. The aim of this research was to develop, optimize, and validate an analytical methodology employing hollow fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) and HPLC for the determination of humulones and lupulones in hops. For this, an experimental design was carried out, which allowed knowing the best conditions for the extraction of humulones and lupulones in hops (i.e. 20 μ L of cyclohexane, extraction time of 32 minutes, agitation of 700 rpm, pH 7 and 0.025 g NaCl). The developed methodology was evaluated according to the requirements of the National Health Surveillance Agency (ANVISA) established in RDC No. 166, of July 24, 2017. The method showed adequate results of linearity and precision for the analysis of humulones; the same was not proven for lupulones. The linearity results for the humulones revealed a determination coefficient of ≥ 0.999 ; recovery of 79.7 to 100.7%; the detection limits for cohumulone and N + adhumulone were 0.09 to 0.25% (m/m), while the limits of quantification for these same compounds were 0.31 - 0.83% (m/m). The new method developed reduced the amount of organic solvent used in preparing the samples by approximately six thousand times. However, further studies are needed to verify the influence of the matrix effect on the determination of humulones and lupulones by HF-LPME and HPLC.

Keywords: sample preparation, HF-LPME, humulones, high performance liquid chromatography, validation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas das humulonas (α -ácidos) e lupulonas (β -ácidos) do lúpulo.....	11
Figura 2 – Via de biossíntese das humulonas e das lupulonas em lúpulo.....	12
Figura 3 – Isomerização da humulona em cis-iso-humulona e <i>trans</i> -iso-humulona.....	13
Figura 4 – Ilustração de dois sistemas de HF-LPME: forma de “U” e em forma de haste.....	20
Figura 5 – Processo de extração com HF-LPME com três fases extratoras.....	24
Figura 6 – Esquema ilustrativo das etapas de preparo da fibra e extração das humulonas e lupulonas por HF-LPME.....	32
Figura 7 – Comparativo entre os cromatogramas de humulonas e lupulonas: A) descrito na literatura e B) obtido em nosso laboratório.....	35
Figura 8 – Resultados da escolha de solventes para extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME.....	36
Figura 9 – Gráfico de Pareto com as variáveis significativas no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1}	38
Figura 10 – Diagrama de solubilidade da humulona, lupulona e ácido humulínico em função do PH.....	41
Figura 11 – Gráfico de Pareto com as variáveis significativas para otimização multivariada da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME.....	43
Figura 12 – Gráfico de contorno das variáveis significativas pH e agitação (rpm) para otimização multivariada da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME.....	45
Figura 13 – Gráfico de contorno das variáveis agitação (rpm) e adição de NaCl (g) para otimização multivariada da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME.....	45
Figura 14 – Gráfico de contorno das variáveis Tempo e pH para otimização multivariada da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME.....	46
Figura 15 – Curva de calibração externa da Cohumulona.....	48
Figura 16 – Curva de calibração externa da N+adhumulona.....	48
Figura 17 – Curva de calibração externa da Colupulona.....	49
Figura 18 – Curva de calibração externa da N+adlupulona.....	49
Figura 19 – Curva de calibração da Cohumulona na amostra fortificada.....	51
Figura 20 – Curva de calibração da n+adhumulona na amostra fortificada.....	51
Figura 21 – Curva de calibração da Colupulona na amostra fortificada.....	52
Figura 22 – Curva de calibração da n+adlupulona na amostra fortificada.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pontos de penalidade para cálculo de eco-escala analítica.....	19
Tabela 2 – Aplicações de HF-LPME no preparo de amostras para diversas matrizes.....	26
Tabela 3 – Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME.....	33
Tabela 4 – Fatores, níveis e domínio experimental para otimização multivariada da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME.....	34
Tabela 5 – Fatores, níveis e resposta área total do cromatograma para o somatório dos picos correspondentes a humulonas e lupulonas no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} ...	37
Tabela 6 – Valores de solubilidade calculada em mg L^{-1} em função do pH para humulona..	40
Tabela 7 – Fatores e níveis codificados para otimização multivariada da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME.....	42
Tabela 8 – Anova do modelo obtido pelo planejamento experimental para otimização do processo de extração.....	46
Tabela 9 – valores dos coeficientes de correlação, determinação, faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação para as curvas de calibração externa das humulonas e lupulonas.....	47
Tabela 10 – Valores dos coeficientes de correlação, determinação, faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação para extração na amostra.	50
Tabela 11 – Tabela ANOVA da regressão linear da cohumulona na matriz fortificada.....	53
Tabela 12 – Tabela ANOVA da regressão linear da n+adhumulona na matriz fortificada.....	53
Tabela 13 – Tabela ANOVA da regressão linear da colupulona na matriz fortificada.....	53
Tabela 14 – Tabela ANOVA da regressão linear da n+adlupulona na matriz fortificada.....	53
Tabela 15 – Valores dos coeficientes angular e linear e os seus respectivos erros para humulonas e lupulonas.....	54
Tabela 16 – Concentração dos analitos em porcentagem na amostra (%m/m) para os pontos baixo, médio e alto para precisão e exatidão para o método de extração de alfa e beta ácidos de lúpulo por HF-LPME.	54
Tabela 17 – Resultados de precisão intra-corrida para o método de determinação de humulonas e lupulonas por HF-LPME e HPLC.....	55
Tabela 18 – Resultados de precisão inter-corrida para o método de extração de alfa e beta ácidos de lúpulo por HF-LPME.....	55
Tabela 19 – Resultados eficiência de extração para o método de extração de alfa e beta ácidos de lúpulo por HF-LPME (% em g de analito extraído por 100g de amostra).....	56
Tabela 20 – Resultados de exatidão do processo de extração de alfa e beta ácidos de lúpulo por HF-LPME.....	56
Tabela 21 – Comparação entre resultados do método internacional e HF-LPME.....	57

Tabela 22 – Penalidades para o método de referência da ASBC.....	58
Tabela 23 – Penalidades para o método proposto utilizando HF-LPME.....	58

Sumário

1. Introdução	10
1.1 Cerveja, lúpulo e resinas amargas	10
1.2 Um pouco de química verde e de química analítica verde	14
1.3 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)	19
1.4 Parâmetros analíticos para validação de métodos	27
2. Objetivos	29
3. Materiais e métodos	29
3.1 Equipamentos	29
3.2 Materiais e Reagentes	30
3.3 Métodos	30
3.3.1 Preparo das soluções-padrão	30
3.3.2 Método cromatográfico para separação de humulonas e lupulonas por HPLC	31
3.3.3 Procedimento de extração por HF-LPME	31
3.4 Otimização da extração de humulonas e lupulonas por HF-LPME	32
3.4.1 Procedimento para escolha do solvente de extração	32
3.4.2 Procedimento para triagem de variáveis	33
3.4.3 Procedimento para Otimização do processo de extração.	33
3.5 Validação	34
3.6 Análise estatística	34
4. Resultados e discussões	34
4.1 Separação cromatográfica das humulonas e lupulonas	34
4.2 Escolha do Solvente	35
4.3 Triagem de variáveis que afetam a extração por HF-LPME	37
4.4 Planejamento composto central para extração	42
4.5 Resultados da validação	47
4.6 Avaliação do nível de verdura das metodologias	57
5. Conclusões	58

1. Introdução

1.1 Cerveja, lúpulo e resinas amargas

Conforme definido no artigo 36, do Decreto nº 6.871, de 2009, cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro (BRASIL, 2009). Em termos de importância socioeconômica, o setor cervejeiro corresponde a 1,6% do PIB brasileiro e recolhe mais de R\$ 20 bilhões ao ano em tributos em todo o país (CERVBRASIL, 2016). A bebida é fonte de vitaminas do complexo B, e favorece o equilíbrio gastrointestinal, o que evita em 40% o aparecimento de pedras nos rins e aumenta o “bom” colesterol em até 4% (BAMFORTH, 2002). Além disso, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece que duas doses de cerveja ao dia são consideradas saudáveis e não causam aumento abdominal, se inseridas em uma dieta balanceada (BAMFORTH, 2002).

O lúpulo (*Humulus Lupulus* Linnaeus) é uma trepadeira dióica e perene, que pertence à ordem das Rosales e à família Cannabaceae (BOCQUET et al., 2018). O gênero *Humulus* apresenta três espécies, *H. Lupulus*, *H. Japonicus* e *H. Yunnanensis*; embora apenas o *H. Lupulus* seja explorado em escala comercial (ALMAGUER et al., 2014; NEVE, 1991). Dados da International Hop Grower's Convention revelam que foram produzidas 117.574 toneladas de flores de lúpulo apenas no ano de 2018 (UREMBERG & ERMANY, 2018). O interesse em produzir flores de lúpulo está diretamente relacionado ao processo de produção cervejeira, pois as flores de lúpulo produzem quantidades adequadas de polifenóis, resinas amargas e óleos essenciais, que são muito importantes para a estabilidade química e para o sabor da bebida (DURELLO, SILVA, BOGUSZ, 2019). O uso do lúpulo na produção de cerveja é antigo e remonta ao século XI, época a partir da qual podem ser encontrados registros do seu uso para melhorar a estabilidade e a qualidade sensorial de cervejas (KOETTER, UWE, BIENDL, 2010; ORAV, ARAK, RAAL, 2006; SKENE et al., 2000).

Em termos de composição química, é apenas nas flores não polinizadas das

plantas femininas de lúpulo que é possível encontrar quantidades suficientes de resinas amargas, ricas em humulonas e lupulonas (α -ácidos e β -ácidos, respectivamente) compostos responsáveis pelo amargor, que é fundamental para o equilíbrio do sabor e para a sensação de saciedade que a cerveja proporciona (MALOWICKI & SHELLHAMMER, 2005).

Humulonas são um grupo de compostos formado pela mistura de cinco moléculas orgânicas quimicamente relacionadas: humulona (35-70% do total de humulonas), cohumulona (20-55%), adhumulona (10-15%), prehumulona (1-10%) e poshumulona (1-3%) (KARABÍN et al., 2016; VERZELE & KEUKELEIRE, 1991). Por sua vez, as lupulonas também correspondem a uma mistura de cinco congêneres: lupulona (30-55% do total de lupulonas), colupulona (20-55%), adlupulona (5-10%), prelupulona (1-3%) e poslupulona (de quantidade ainda não estabelecida na literatura) (VERZELE & KEUKELEIRE, 1991). As estruturas químicas das humulonas e lupulonas podem ser observadas na Figura 1.

Figura 1 – Estruturas químicas das humulonas (α -ácidos) e lupulonas (β -ácidos) do lúpulo.

Fonte: adaptado de KARABÍN et al., 2016.

Humulonas e lupulonas possuem rotas bioquímicas de formação que partem do mesmo grupamento beta-tricarbonil conjugado (Figura 2). O seu núcleo aromático é formado pela condensação de três moléculas de malonil-CoA e uma cadeia de isovaleril-CoA que dão origem a um derivado acilfloroglucinol, por ação da enzima valerofenona sintase (BOCQUET et al., 2018; TSURUMARU et al., 2012). No caso da formação das humulonas, o derivado acilfloroglucinol pode sofrer a adição de novas cadeias preniladas que têm origem em moléculas de dimetilalil pirofosfato (TSURUMARU et al., 2012). Assim, se ocorrerem duas prenilações forma-se a mono-prenil floróisovalerofenona, por ação da ação da enzima *humulus*

lupulus preniltansferase-1 (BOCQUET et al., 2018). No caso de três prenilações, forma-se a di-prenil floroisovalerofenona, por ação da enzima preniltansferase. Em seguida, ocorre uma etapa de oxidação, via enzima monooxigenase, que dará origem às humulonas. No caso das lupulonas a rota é basicamente a mesma, com diferença para o fato de que ocorre uma prenilação extra no derivado acilfloroglucinol (DURELLO, SILVA, BOGUSZ, 2019).

Figura 2 – Via de biossíntese das humulonas e das lupulonas em lúpulo.

Fonte: adaptado de TSURUMARU et al., 2012. DMAPP: Dimetilalil pirofosfato; PT: Preniltansferase; MO: Monooxigenase.

Durante o processo de fabricação da cerveja, na etapa de fervura do mosto

cervejeiro, as humulonas sofrem um rearranjo no qual são convertidas em seus isômeros formando as iso-humulonas (Figura 3), em um processo com rendimento de aproximadamente 25-35%. Vale a pena destacar também que a configuração cis/trans das humulonas é determinada em relação à orientação do grupo hidroxila presente no carbono 4 e a cadeia prenilada presente no carbono 5, sendo assim, a configuração trans se refere à direção oposta dos substituintes dos carbonos 4 e 5 (VERZELE & KEUKELEIRE, 1991).

Figura 3 – Isomerização da humulona em *cis*-iso-humulona e *trans*-iso-humulona.

Fonte: adaptado de: KARABÍN et al., 2016.

O processo de isomerização das humulonas é importante para aumentar sua solubilidade no mosto cervejeiro e também para aumentar o seu amargor, isto é, iso-humulonas são mais amargas que humulonas. Durante o processo de isomerização ocorre a formação de dois diastereoisômeros para cada uma das cinco moléculas de humulonas (VERZELE & KEUKELEIRE, 1991). Além disso, o processo de isomerização é favorecido em temperaturas elevadas (100 a 130 °C) e em valores de pH acima da neutralidade (MALOWICKI & SHELLHAMMER, 2005). Nas condições encontradas no mosto cervejeiro a razão entre os isômeros cis/trans formados é de aproximadamente 68:32 (ALMAGUER et al., 2014).

As lupulonas, diferentemente das humulonas, não sofrem isomerização durante a etapa de fervura do mosto cervejeiro, além disso, a existência da cadeia lateral isoprenila extra torna-as mais hidrofóbicas que as humulonas, sendo praticamente insolúveis no mosto e pouco presentes na cerveja (BAXTER & HUGHES, 2001). Entretanto, os produtos de oxidação das lupulonas também contribuem para o amargor da cerveja, embora estas sejam mais conhecidas por sua ação antimicrobiana, isto é, por protegerem a cerveja de contaminações indesejadas. O mecanismo pelo qual as lupulonas atuam como antimicrobianos está relacionado à

sua incorporação pelas membranas celulares dos microorganismos, onde acabam atuando como carreadores ionóforos móveis, modificando o fluxo de íons na membrana, levando ao acúmulo intracelular de prótons, à dissipação do gradiente de íons transmembrana, à diminuição na absorção de nutrientes e à consequente morte celular (DURELLO, SILVA, BOGUSZ, 2019).

Resumidamente, o lúpulo por ser rico em humulonas e lupulonas, é fundamental para o processo cervejeiro, uma vez que contribui para o amargor e para a estabilidade antimicrobiana da cerveja. Desta forma, a quantificação destes compostos em lúpulo é fundamental para: i) estabelecer o seu preço de comercialização a cada nova safra (em função da variação dos fatores edafoclimáticos e das práticas agrícolas); ii) permitir a avaliação do rendimento da produção de uma determinada área em toneladas de humulonas produzidas por hectare; iii) para se escolher e calcular a quantidade correta de lúpulo que será utilizado em uma receita cervejeira, de modo a se alcançar as características desejadas para o estilo da bebida que está sendo produzida e; iv) para manter o padrão de qualidade de aroma e sabor entre os diferentes lotes de produção cervejeira (DURELLO, SILVA, BOGUSZ, 2019).

1.2 Um pouco de química verde e de química analítica verde

Algumas metodologias oficiais da American Society of Brewing Chemists (ASBC) e European Brewery Convention (EBC) para quantificação de humulonas e lupulonas em lúpulo utilizam cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) após a etapa de preparo de amostra, na qual ocorre a extração dos analitos pelo emprego de algumas centenas de mililitros de solventes como éter dietílico, metanol, tolueno ou 2,2,4-trimetilpentano (iso-octano) (ASBC, 2010). Em função disso, em uma análise de controle de qualidade de lúpulo são gerados cerca de 120 mL de uma mistura de solventes para cada replicata de análise, ou cerca de 360 mL para cada amostra avaliada em triplicata. Considerando-se que na rotina laboratorial são realizadas dezenas, e em alguns casos, centenas de análises diárias, não é pequena a quantidade de resíduos gerada. Estes resíduos necessariamente terão de ser neutralizados e descartados, o que é uma fonte de custos para o laboratório.

Sendo assim, existe uma demanda quanto à redução do consumo de solventes empregados em análises laboratoriais e adequação aos conceitos da química verde;

o que pode ser conseguido pela miniaturização dos procedimentos de extração (LUIZ, MACIEL, LANÇAS, 2015). As técnicas miniaturizadas de modo geral permitem a integração da extração e do enriquecimento dos analitos para obtenção de menores limites de detecção (ng L^{-1}) utilizando volumes de até 100 μL de solvente. Além disso, também proporcionam a redução do número de etapas no processo de extração, e a diminuição de erros no procedimento analítico como consequência da diminuição das etapas do processo de preparo de amostras, diminuindo também o consumo de solventes e o custo das análises (SPIETELUN et al., 2014).

A química verde, ou química para o desenvolvimento sustentável, é um conceito que surgiu no início da década de 90, a partir da descrição do conceito de desenvolvimento sustentável, que foi publicado no relatório da comissão mundial sobre o meio ambiente em 1987. Neste documento ficou estabelecido que as demandas da geração atual em satisfazer suas necessidades não devem impossibilitar que as gerações futuras façam o mesmo (BRUNDTLAND, 1987). A partir de então, em 1990 foi publicado o primeiro artigo científico utilizando o termo “green chemistry”, sendo que o número de publicações relativas ao tema permaneceu praticamente constante até 1998, quando o número de publicações científicas passou a crescer de maneira significativa (SOUSA-AGUIAR et al., 2014).

O conceito da química verde tem por base construir um novo paradigma e mudar a forma do pensamento vigente, mudando a forma de se fazer química, seja na etapa de projeto de novas rotas de síntese, no uso de substâncias menos agressivas ao meio ambiente, na necessidade de desenvolver processos mais seguros e na substituição dos processos antigos por opções mais seguras e limpas (PRADO, 2003). Para isso, os processos químicos foram agrupados em três grandes categorias: a) com uso de fontes renováveis de matérias-primas ou reciclagem; b) com melhor eficiência energética e, c) pelo uso de substâncias menos tóxicas, menos persistentes e não biocumulativas (SOUSA-AGUIAR et al., 2014). Considerando-se esta abordagem, Anastas e Warner (ANASTAS; WARNER, 1998) descreveram os princípios da química verde como é descrito a seguir.

1. Prevenção: deve-se sempre evitar a formação de resíduos ao invés de apenas tratar os resíduos gerados.

2. Economia atômica: deve-se projetar rotas de síntese química que incorporem nos produtos da síntese a maior quantidade possível de átomos dos reagentes.
3. Síntese de produtos menos perigosos: as rotas de síntese devem, sempre que possível, utilizar ou gerar substâncias não tóxicas para o meio-ambiente e para o homem.
4. Design de produtos seguros: os produtos gerados em processos de síntese química devem, ao mesmo tempo, atender às necessidades para as quais foram criados sem, no entanto, apresentar toxicidade para o meio-ambiente e para o homem.
5. Solventes e auxiliares mais seguros: reduzir ao máximo o uso de substâncias auxiliares nos processos químicos como, por exemplo, solventes, agentes de separação e sais para secagem de amostras. Caso estes sejam necessários devem apresentar a menor toxicidade possível para o meio-ambiente e para o homem.
6. Busca pela eficiência energética: sempre que possível, os processos químicos devem ocorrer à temperatura ambiente e à pressão atmosférica.
7. Fontes renováveis de matérias-primas: sempre que possível deve-se priorizar o uso de matérias-primas renováveis nos processos de síntese química.
8. Evitar a formação de derivados: sempre que possível, evitar etapas que empreguem bloqueadores ou modificadores temporários, pois estes usualmente geram resíduos químicos.
9. Catálise: o uso de catalisadores é sempre recomendado para reduzir tempo e energia nos processos químicos.
10. Design para degradação: priorizar o desenvolvimento de projeto cujos produtos sejam de fácil degradação no meio ambiente (isto é, não tóxicos e não persistentes).
11. Análise em tempo real para a prevenção de acidentes: utilizar tecnologias para o monitoramento dos processos químicos que evitem a formação de substâncias tóxicas para o homem e para o meio ambiente.

12. Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes: utilizar reagentes com baixo risco para minimizar as chances de acidentes como explosões, incêndios e lesões causadas pelo contato com a pele.

A partir destes doze princípios da química verde, no âmbito da química analítica, principalmente no que diz respeito às etapas de preparo de amostras e a análise química propriamente dita, foram propostos os princípios da “química analítica verde” como é descrito a seguir (ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2009).

1. Buscar e empregar de métodos analíticos diretos, minimizando o preparo de amostras.
2. Reduzir a quantidade de amostras e o número de amostras por análise.
3. Buscar por métodos analíticos *in situ*.
4. Integrar operações e processos analíticos reduzindo-se o uso de energia e de reagentes.
5. Buscar e empregar métodos automatizáveis e miniaturizados.
6. Evitar, sempre que possível, o uso de reações de derivatização.
7. Evitar a geração de grandes volumes de resíduos, e caso isso não for possível, os resíduos devem ser devidamente tratados.
8. Priorizar o uso de métodos multi-analitos e de parâmetros multi-variados.
9. Minimizar o uso e consumo de energia.
10. Priorizar reagentes oriundos de fontes renováveis.
11. Eliminar ou substituir reagentes tóxicos para o meio ambiente e para o homem.
12. Buscar por maior segurança do analista.

Com base no exposto, na presente pesquisa trabalhamos para adequar a etapa de preparo de amostras para quantificação de humulonas e lupulonas em lúpulo, através da miniaturização da etapa de preparo de amostras pelo uso de microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME). Para isso, foram utilizados conceitos como a redução da quantidade de amostra, uso de pequenas quantidades de solventes se comparado com os métodos oficiais de análise e a utilização de

design de experimentos para otimização multivariada do processo de preparo de amostras.

Com objetivo de auxiliar o desenvolvimento de novos processos químicos, foram formuladas maneiras de avaliar o impacto ambiental causado. O uso de economia atômica, fator-E e o uso de uma eco-escala, são exemplos de métodos que podem ser utilizados para essas medidas, entretanto, estes métodos apresentam dificuldades de ser aplicados em metodologias analíticas (RIDDHI; SHUCHI, 2019).

Uma abordagem para avaliar o grau de veracidade de um método analítico é o uso de uma eco-escala analítica baseada em um modelo de penalidades, como o descrito por Gałuszka e colaboradores (GAŁUSZKA et al., 2012). Com este modelo, é possível desenvolver metodologias analíticas, contornando-se problemas decorrentes da variabilidade de resultados analíticos em função de etapas e processos. Além de considerar fatores como a exposição do analista a produtos perigosos e a quantidade de energia dispendida no processo.

Para esta avaliação, se utiliza uma tabela de penalidades como pode ser observado na Tabela 1, enquanto o risco relacionado ao uso de substâncias é calculado com base nos pictogramas de perigo GHS-BR (isto é, produto inflamável, corrosivo, etc.). Uma substância que não apresenta pictogramas de perigo não recebe penalidades. Pictogramas que apresentam menor risco recebem 1 ponto de penalidade; Pictogramas que possuem maior risco apresentam 2 pontos de penalidade, e assim por diante.

A pontuação do método então é calculada subtraindo-se os pontos de penalidade de um valor total de 100. Desta forma, o critério utilizado para avaliar os métodos analíticos segue da seguinte forma: métodos que apresentem uma pontuação maior que 75, são considerados excelentes métodos analíticos verdes, métodos que apresentem uma pontuação superior a 50 são considerados aceitáveis, ao passo que métodos que possuam uma pontuação menor que 50 são considerados inadequados (GAŁUSZKA et al., 2012).

Tabela 1 – Pontos de penalidade para cálculo de eco-escala analítica.

Reagente		Sub-total PP	Total PP
Quantidade	<10 mL (g)	1	Quantidade X Perigo
	10-100 mL (g)	2	
	>100 mL (g)	3	
Pictogramas de perigo	Nenhum	0	
	Menor perigo	1	
	Maior perigo	2	
Energia	<0,1 kWh por amostra		0
	<1,5 kWh por amostra		1
	>1,5 kWh por amostra		2
Risco ocupacional	Processo analítico hermetizado		0
	Emissão de vapores para atmosfera		3
Resíduos	Nenhum		
	<1 mL (g)		0
	1-10 mL (g)		1
	>10 mL (g)		3
	Reciclagem		5
	Degradação		0
	Passivação		1
	Sem tratamento		2
			3

Adaptado de: GAŁUSZKA et al., 2012.

Neste trabalho foi utilizada esta metodologia a fim de comparar o ganho no nível de verdura do método desenvolvido com relação ao método de preparo de amostra para quantificação de humulonas e lupulonas por HPLC da ASBC (ASBC, 2011).

1.3 Microextração em fase líquida com fibra oca (HF-LPME)

A etapa de preparo de amostras é considerada uma das mais críticas em uma determinação analítica. Seu objetivo é extrair e concentrar os analitos, bem como remover interferentes dos extratos contendo os compostos de interesse. Neste contexto, as técnicas de microextração têm obtido destaque por utilizar pequenas quantidades de solventes de extração se comparadas às técnicas de preparo de amostras tradicionais, reduzindo assim, de forma significativa, a quantidade de resíduos gerados (YAMINI; REZAZADEH; SEIDI, 2019). As microextrações em fase líquida (do inglês Liquid-Phase Microextraction ou LPME) são técnicas de preparo de amostra que utilizam pequenas quantidades de solvente, usualmente até 100 microlitros, para realizar a extração dos analitos da amostra. Por gerar uma

quantidade muito menor de resíduos e diminuir a exposição do analista aos solventes durante a extração, são consideradas técnicas em maior acórdância com os princípios da química analítica verde, quando comparadas às técnicas de preparo de amostras tradicionais. Além disso, a LPME combina a extração, a pré-concentração e, muitas vezes, a introdução da amostra no sistema cromatográfico em um só passo. As técnicas de LPME podem ser classificadas como: microextração em gota única (do inglês Single Drop Microextraction ou SDME), microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês Dispersive Liquid-Liquid Microextraction ou DLLME) e microextração em fase líquida com fibra oca (do inglês Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction ou HF-LPME) (ASENSIO-RAMOS et al., 2011).

A HF-LPME baseia-se na extração dos analitos pelo emprego de um solvente extrator confinado em uma fibra oca porosa que é mergulhada dentro da solução aquosa que contém os analitos de interesse. Uma figura representativa dos sistemas de HF-LPME mais comuns pode ser observada na Figura 4.

Figura 4 – Ilustração de dois sistemas de HF-LPME: em forma de “U” e em forma de haste.

Adaptado de: (ZHANG et al., 2013).

A fibra utilizada é composta de polipropileno com 70% de superfície porosa, com diâmetro interno de 600 μm e tamanho de poro de 0,2 μm (LUIZ, MACIEL, LANÇAS, 2015). Para um adequado procedimento de extração, a fibra é

previamente mergulhada (lavada) em um solvente para fixá-lo no interior de seus poros. Após um curto período de tempo (usualmente 10 a 20 segundos), a fibra é retirada do solvente no qual ficou mergulhada e uma rápida secagem é realizada para se remover o excesso de solvente. Em seguida, a fibra é preenchida com uma alíquota da fase receptora (volumes de até 100 uL) e mergulhada na amostra aquosa contendo os analitos de interesse (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008). Um detalhe importante no processo é que em HF-LPME o solvente utilizado para acondicionar a fibra deve ser imiscível em água para que não ocorram perdas de solvente durante o processo de extração. Durante a extração, os analitos são capturados da amostra aquosa para a fase receptora através dos poros da fibra oca (LUIZ, MACIEL, LANÇAS, 2015). Uma adequada agitação pode ser acrescentada para facilitar as etapas de transferência de massa e acelerar o processo de extração.

A HF-LPME pode ser realizada de duas maneiras, utilizando-se duas ou três fases extratoras. Quando a fase receptora é composta pelo mesmo solvente utilizado para o acondicionamento da fibra, o sistema é chamado de bifásico. Nele, os analitos são extraídos por difusão passiva da amostra para a fase receptora e a eficiência do processo de extração depende majoritariamente da afinidade do analito pelo solvente (MERIB & CARASEK, 2013). Desta forma, um equilíbrio entre as fases doadora e receptora é estabelecido de modo:

$$C_{receptora} \rightleftharpoons C_{doadora} \quad (1)$$

No qual: $C_{receptora}$ é a concentração do analito na fase receptora no equilíbrio e $C_{doadora}$ é a concentração do analito na fase doadora no equilíbrio.

Este processo de extração, no caso de analitos neutros, depende do coeficiente de partição entre as duas fases:

$$k_{r/d} = \frac{C_{receptora}}{C_{doadora}} \quad (2)$$

No qual: $k_{r/d}$ é o coeficiente de partição entre a fase receptora e a fase doadora, o índice r é referente a fase receptora e o índice d é referente a fase doadora.

Para analitos de caráter ácido ou básico, o pH da solução doadora tem forte influência no processo de extração e é mais adequado o uso do coeficiente de distribuição ($D_{aceptora/doadora}$) do analito no lugar de seu coeficiente de partição. Desta

forma o $D_{\text{aceptora/doadora}}$ pode ser obtido pela equação abaixo

$$D_{r/d} = \frac{C_{\text{receptora}}}{C_{\text{doadora}}} = \alpha_D \times k_{r/d} \quad (3)$$

Onde α_D é a fração do analito com afinidade pela fase extratora e pode ser calculado com o valor de pH da fase doadora e do valor de pK_a do analito.

$$\alpha_D = \frac{1}{1 + 10^{S(pH - pK_a)}} \quad (4)$$

Onde S é uma constante que assume o valor de +1 para analitos ácidos e -1 para analitos básicos. Vale ressaltar que esta equação pode ser utilizada apenas para ácidos e bases monopróticos. Alternativamente, ao se lidar com analitos ácidos, isto é, com o valor de S igual a +1, (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012) pode-se utilizar outra equação dependente do valor da concentração de hidrogênio da fase doadora e do valor de K_a .

$$\alpha_D = \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} \quad (5)$$

Onde $[H^+]$ é a concentração de hidrogênio na fase doadora e K_a é a constante de ionização do analito ácido.

A eficiência de extração pode ser calculada considerando-se a quantidade de matéria extraída com relação à quantidade total de matéria na solução doadora antes do processo de extração (ESRAFILI et al., 2018). Pode-se também utilizar uma equação dependente da constante de distribuição do analito e dos volumes da fase doadora e receptora

$$E = \frac{n_{\text{receptora}}}{n_{\text{receptora}} + n_{\text{doadora}}} \times 100 = \frac{D_{r/d} \times V_{\text{receptora}}}{D_{r/d} \times V_{\text{receptora}} + V_{\text{doadora}}} \times 100 \quad (6)$$

O fator de pré-concentração fornece uma ideia de quanto a concentração do analito foi magnificada e pode ser calculado utilizando a equação:

$$FP = \frac{C_{\text{receptora}}}{C_{\text{inicial}}} = \frac{E \times V_{\text{doadora}}}{100 \times V_{\text{receptora}}} \quad (7)$$

Onde E é a eficiência de extração, V_{doadora} é o volume da fase doadora, $V_{\text{receptora}}$ é o volume da fase receptora e C_{inicial} é a concentração do analito no início do processo de extração.

Com relação à cinética de extração, o processo pode ser descrito pela equação

em função do tempo:

$$C_{receptora} = C_{receptora,eq} \times (1 - e^{-kt}) \quad (8)$$

Onde k é uma constante com dimensão s^{-1} e pode ser definida como:

$$k = \frac{A_i}{V_{org}} \beta_0 (D_{r/d} \frac{V_{org}}{V_{doadora}} + 1) \quad (9)$$

Onde A_i é área de interface da fibra, V_{org} é o volume total da fase orgânica, β_0 é o coeficiente de transferência de massa em relação a fase orgânica, $D_{r/d}$ é o coeficiente de distribuição entre a fase receptora e a fase doadora. Segundo GRØNHAUG HALVORSEN; PEDERSEN-BJERGAARD e RASMUSSEN (2001), nesta equação pode-se observar que, para minimizar o tempo de extração, deve-se: i) aumentar a área de contato entre a fase doadora e a receptora, sendo que aumentar o tamanho da fibra também pode ser uma opção, assim como evitar que a mesma, toque as paredes do frasco e; ii) aumentar a transferência de massa, utilizando-se solventes com maior afinidade pelo analito e minimizar o volume da fase doadora. Além disso, esta equação ainda mostra que a concentração do analito aumenta inicialmente de forma linear, atingindo após um tempo uma situação de equilíbrio (ESRAFILI et al., 2018).

Para analitos de caráter ácido ou básico, pode-se também trabalhar com sistemas de três fases, neste caso, a fibra é acondicionada com um solvente orgânico imiscível em água que servirá como barreira entre as fases doadora e receptora. E a fase receptora neste caso é uma solução na qual o analito irá apresentar-se ionizado. Este sistema é chamado de trifásico, pois os analitos migram da amostra (fase doadora), para o solvente de impregnação presente na fibra (fase extratora) e desta para a fase dentro da fibra (fase receptora) (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 2008). Este sistema depende de dois equilíbrios líquido-líquido que ocorrem simultaneamente. O primeiro entre a fase doadora aquosa e a fase orgânica acondicionada nos poros da fibra, e o segundo entre a fase orgânica acondicionada nos poros da fibra e a fase receptora aquosa do seguinte modo:

$$C_{doadora} \rightleftharpoons C_{fase\ orgânica} \rightleftharpoons C_{receptora} \quad (10)$$

No qual: $C_{doadora}$ é a concentração do analito na fase doadora, $C_{fase\ orgânica}$ é a concentração do analito na fase orgânica e $C_{receptora}$ é a concentração do analito na

fase receptora.

Para este sistema, deve-se considerar o caráter ácido-base do analito. Quando o analito presente na fase doadora apresentar caráter ácido, deve-se acidificar o meio, de forma a se deslocar o equilíbrio ácido no sentido de formação da espécie neutra, (que tende a possuir maior afinidade pela fase orgânica quando comparada a espécie desprotonada). O analito então migra por difusão passiva para o solvente presente nos poros da fibra, atingindo o lúmen da fibra contendo uma solução mais alcalina. Na fase no interior da fibra o analito se desprotona, tornando-se carregado, e então perde afinidade pela fase orgânica no interior dos poros da fibra, permanecendo retido no solvente confinado no lume da fibra. Na Figura 5 é possível observar o processo de extração utilizando-se três fases.

Figura 5 – Processo de extração com HF-LPME com três fases extradoras.

Adaptado de: (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012).

Neste processo, o coeficiente de distribuição total ($D_{r/d}$) deve ser considerado e pode ser calculado como a razão entre os coeficientes de distribuição da fase orgânica com a de fase doadora ($D_{org/d}$) e o coeficiente de distribuição entre a fase receptora e a fase orgânica ($D_{r/org}$) sendo:

$$D_{r/d} = \frac{c_{eq,r}}{c_{eq,d}} = \frac{D_{org/d}}{D_{org/r}} = \frac{\alpha_d k_{org/d}}{\alpha_r k_{org/r}} \cong \frac{\alpha_d}{\alpha_r} \quad (11)$$

Onde: $C_{eq,r}$ é a concentração total do analito na fase receptora no equilíbrio; $C_{eq,d}$ a concentração total do analito na fase doadora no equilíbrio, α_d é a fração do analito com maior afinidade com a fase orgânica impregnada na fibra na fase doadora; α_r é a fração do analito com maior afinidade com a fase orgânica impregnada na fibra na fase receptora; $k_{org/d}$ e $k_{org/r}$ são os coeficientes de partição entre a fase orgânica impregnada na fibra e as fases doadora e receptora (PSILLAKIS & KALOGERAKIS, 2003). Nesta equação, os coeficientes $k_{org/d}$ e $k_{org/r}$ são essencialmente os mesmos, sendo assim, o coeficiente de distribuição entre as fases é dependente de α_d e α_r . O conceito então neste sistema, para maximizar a extração é maximizar α_d , facilitando a transferência do analito para o solvente contido na fibra e minimizar α_r de modo a impedir a saída do analito do lume da fibra (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012).

A eficiência de extração segue o mesmo conceito do sistema bifásico

$$E = \frac{n_{receptora}}{n_{receptora} + n_{doadora} + n_{org}} \times 100 = \frac{D_{r/d} \times V_{receptora}}{D_{r/d} V_{receptora} + D_{org/d} \times V_{org} + V_{doadora}} \times 100 \quad (11)$$

É possível observar então que a eficiência do processo de extração no sistema de três fases é dependente de dois coeficientes de distribuição relativos à interação com a fase orgânica e as fases receptora e doadora e do volume da fase doadora. Neste sistema, da mesma forma que no sistema de duas fases, a redução no volume da fase doadora favorece a eficiência do processo de extração e, em geral, altos coeficientes de partição favorecem a interação do analito com a fase orgânica presente na fibra, facilitando a transferência de massa para a fase receptora (GHAMBARIAN; YAMINI; ESRAFILI, 2012).

Para este sistema, considerando-se um analito ácido, o valor de pH da fase doadora deve ser ácido, preferencialmente três unidades abaixo do pKa do analito, enquanto que o pH da fase receptora deve ser alcalino, preferencialmente três unidades de pH acima do pKa do analito aplicando-se a mesma lógica para analitos básicos (HADI; MAKAHLEH; SAAD, 2012).

O fator de pré-concentração pode ser calculado da mesma forma que no sistema de duas fases utilizando-se a mesma equação. Como no sistema trifásico apresenta dois equilíbrios simultâneos, a equação cinética é muito mais complexa mais ainda é controlada pela razão entre o volume da fase doadora e receptora e

pelas quatro constantes cinéticas, que por sua vez são afetadas pela área superficial e pelo coeficiente de partição do analito.

Uma grande vantagem do preparo de amostras por HF-LPME é que a própria fibra funciona como um filtro e, uma vez que a extração é realizada pelo solvente, este pode ser recolhido e diretamente injetado no sistema cromatográfico sem passos adicionais (YAMINI; REZAZADEH; SEIDI, 2019). No entanto, por se tratar de um processo de extração de equilíbrio, são necessários desenvolvimentos relativos à escolha de um solvente com grande afinidade e, conseqüentemente, grande capacidade de extração dos analitos da amostra, bem como a realização de processos de otimização dos parâmetros de extração como tempo de extração, velocidade de agitação, adição de sal (efeito *salting out*) e ajuste do pH.

A técnica de HF-LPME vem sendo muito utilizada no preparo de amostras para determinação de diferentes tipos de analitos em diferentes matrizes, como pode ser visualizado na Tabela 2. Em alguns casos, quando uma etapa adicional de derivatização do analito é necessária, esta também pode ser realizada dentro da própria fibra, pela adição do agente derivatizante à fase receptora (JING; LI; JIANG, 2016).

Tabela 2 – Aplicações de HF-LPME como preparo de amostra para diversas matrizes.

Analito e Matriz	Tipo de sistema	Separação e detecção	Limite de Detecção	Referência
Interferentes endócrinos em água	Três fases	HPLC-FD	0,52-0,54 ng/mL	(VILLAR-NAVARRO et al., 2013)
Antibactericidas em alimentos de origem animal.	Três fases	HPLC-DAD	1,25-40 ng/g	(TAJABADI et al., 2016)
Pesticidas em águas naturais.	Duas fases	GC-MS	0,04-0,44 µg/L	(MENEZES et al., 2016)
Organoclorados em tecidos	Duas fases	GC-MS	0,06-2,30 ng/g	(CAI et al., 2016)
Ftalatos e metabólitos de ftalatos em urina humana.	Duas fases	GC-MS	0,77-23,3 µg/L	(FERNANDEZ; ANDRÉ; CARDEAL, 2017)
Quercetina em plasma humano e amostras vegetais.	Duas fases	HPLC-UV	0,33 ng/L	(RANJBAR BANFORUZI; HADJMOHAMMADI, 2017)
Cromo VI em água	Três fases	µPAD	3 µg/mL	(ALAHMAD et al., 2018)
Derivados carbonilas de águas tratadas com ozônio.	Duas fases	GC-ECD	0,5-0,8 µg/L	(SOBHI et al., 2019)

Fonte: autoria própria.

1.4 Parâmetros analíticos para validação de métodos

A validação de um método analítico pode ser definida como o processo de avaliação a que o método analítico é submetido, de forma sistemática, por meio de ensaios experimentais bem definidos, capazes de fornecer evidências objetivas e inequívocas de que as medições químicas realizadas são confiáveis, comparáveis e até mesmo rastreáveis (BRASIL, 2017; RIBANI et al., 2004).

Segundo RIBANI et al., (2004), no Brasil, existem as seguintes agências credenciadoras para verificar a competência de laboratórios analíticos: i) Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e, ii) Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Estes órgãos elaboram guias para o procedimento de validação de métodos analíticos como, por exemplo, a Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA nº 166, de 24 de julho de 2017 (BRASIL, 2017) e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de junho de 2007 (INMETRO, 2007).

Neste sentido é fundamental esclarecer que resoluções são documentos com poder de lei, que devem ser obedecidas e guias são documentos de caráter orientativo (KRULL & SWARTZ, 1998; RIBANI et al., 2004). Em função disso, neste trabalho de mestrado a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 foi adotada como guia para a etapa de validação analítica.

Os parâmetros analíticos escolhidos para validação parcial do método aqui desenvolvido foram os seguintes: linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e limites de quantificação. A seguir, apresentamos brevemente as definições destes parâmetros segundo a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

A **linearidade** pode ser definida como a capacidade de um método em apresentar uma resposta diretamente proporcional à concentração do analito em uma dada amostra, sendo avaliada em toda a faixa de trabalho definida para o método. A avaliação da linearidade se dá através da apresentação gráfica das respostas em função da concentração do analito, da avaliação da equação obtida a partir do método dos mínimos quadrados, observando-se os coeficientes de correlação (r) e de determinação (r^2), apresentando um valor superior a 0,990 e coeficiente angular significativamente diferente de zero e através da significância do coeficiente angular (BRASIL 2017).

A **precisão** pode ser definida como a avaliação da proximidade entre os

resultados das análises realizadas com amostras preparadas de maneira independente pelo método estudado. E deve ser demonstrada pelo cálculo do desvio-padrão relativo, e pode ser expressa através da repetibilidade (precisão intra-corrida), da precisão intermediária (precisão inter-corrida) e da reprodutibilidade (Brasil 2017).

A **repetibilidade** deve seguir os seguintes critérios: realizar o procedimento analítico utilizando-se as mesmas condições de operação com o mesmo analista e instrumentação em uma única corrida analítica e obter 9 resultados a partir de 3 níveis contemplando toda faixa de trabalho (Brasil 2017).

A **precisão intermediária** deve seguir os seguintes critérios: utilizar os mesmos níveis com o mesmo número de determinações que a repetibilidade e ser realizada com a mesma amostra no mesmo laboratório em dias diferentes da repetibilidade, por analistas diferentes. Já a reprodutibilidade deve ser obtida através de trabalhos colaborativos com outros laboratórios (Brasil 2017).

A **exatidão** avalia o grau de concordância entre os resultados obtidos de forma individual pelo método a ser avaliado e um valor previamente aceito como confiável. Da mesma forma que a precisão, a exatidão deve ser observada a partir de 9 resultados obtidos de 3 concentrações que contemplem toda faixa de trabalho (Brasil 2017).

O **limite de detecção (LD)** é a menor quantidade do analito presente na amostra capaz de ser detectado sem necessariamente ser quantificado dentro das condições estabelecidas (Brasil 2017). Neste trabalho, o limite de detecção foi determinado utilizando-se o desvio-padrão residual do coeficiente linear da linha de regressão seguindo a seguinte fórmula:

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{IC} \quad (12)$$

Onde σ é o desvio-padrão residual do coeficiente linear da linha de regressão e IC é a inclinação da curva de calibração.

O **limite de quantificação (LQ)** é a menor quantidade do analito presente na amostra capaz de ser detectado e quantificado dentro das condições analíticas estabelecidas apresentando precisão e exatidão (Brasil 2017). Neste trabalho, o limite de detecção também foi determinado utilizando-se o desvio-padrão residual do

coeficiente linear da linha de regressão seguindo a seguinte formula:

$$LD = \frac{10 \times \sigma}{IC} \quad (13)$$

Onde σ é o desvio-padrão residual do coeficiente linear da linha de regressão e IC é a inclinação da curva de calibração.

Pelo exposto, e no melhor do nosso conhecimento, não foram encontradas publicações que relatassem o uso de HF-LPME para extração de humulonas e lupulonas em lúpulo, de modo que esta pode ser uma alternativa viável para economia de solventes e a redução de custos na etapa de extração destes compostos para avaliação de qualidade do lúpulo.

2. Objetivos

O objetivo geral desta pesquisa foi desenvolver, otimizar e validar uma metodologia analítica empregando-se HF-LPME e HPLC para determinação de humulonas e lupulonas em lúpulo.

Para tanto, foram realizados os seguintes objetivos específicos:

- Separação cromatográfica das humulonas e lupulonas por HPLC.

- Realização da escolha do solvente mais apropriado para extração de humulonas e lupulonas por HF-LPME em lúpulo.

- Utilizando o solvente com melhor capacidade de extrair os analitos de interesse, otimizar as condições de extração por metodologia de superfície de resposta.

- Validar o método obtido através das figuras de mérito: linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e limites de quantificação.

- Realizar a determinação de humulonas e lupulonas em lúpulos comerciais, utilizando o método validado.

3. Materiais e métodos

3.1 Equipamentos

Para as etapas de escolha de solvente, triagem de variáveis e otimização da extração das humulonas e lupulonas, foi utilizado um cromatógrafo à líquido de alta eficiência (HPLC), marca Shimadzu, modelo LC20AD, dotado de auto-injetor

Shimadzu, modelo SIL20AHT e detector também da Shimadzu SPD-6AV (UV comprimento de onda fixo). A separação ocorreu em uma coluna de fase reversa Agilent eclipse XDB-C18, 4,6 mm × 250 mm e partícula de 5 µm.

3.2 Materiais e Reagentes

- Fibra de polipropileno poroso Accurel PP Q 3/2 0,2 µm de tamanho do poro, 600 µm de diâmetro interno e 200 µm de espessura da parede.
- Metanol grau HPLC da J. T. Baker.
- Ácido fosfórico 85% da Macron Fine Chemicals.
- Água ultra purificada em sistema Milli-Q.
- Padrão de humulonas e lupulonas ICE-3 da American Society of Brewing Chemists.
- Ciclohexano da Mallinckrodt Chemicals.
- Hexano grau HPLC da Sigma-Aldrich.
- Heptano da Sigma-Aldrich.
- Tolueno grau HPLC da Honeywell.
- Éter dihexílico da Sigma-Aldrich.
- 1-octanol da Sigma-Aldrich.

3.3 Métodos

3.3.1 Preparo das soluções-padrão

O preparo das soluções-estoque dos padrões de humulonas e lupulonas foi realizado pelo uso do padrão certificado da ASBC denominado de ICE-3. Este padrão é um material de referência para análises químicas, obtido por extração supercrítica de flores de lúpulo. O ICE-3 é composto por uma mistura de 44,64% (m/m) de humulonas (isto é, 13,88 % de cohumulona e 30,76 % de humulona + adhumulona), e de 24,28% de lupulonas (isto é, 13,44 % de colupulona e 10,84 % de lupulona + adlupulona). O preparo do padrão para elaboração da solução estoque foi realizado diariamente segundo as recomendações da American Society of Brewing Chemistry (ASBC, 2011). Resumidamente, o preparo consistiu em retirar

o padrão do freezer e colocá-lo em dessecador até atingir temperatura ambiente. Após o equilíbrio térmico, o padrão foi homogeneizado e uma solução estoque foi preparada pesando-se 0,5056 g em um béquer de 50 mL, adicionou-se 30 mL de metanol sobre o padrão e foi utilizado um banho ultrassônico para facilitar a dissolução até a obtenção de uma solução homogênea. Esta solução foi então transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume do balão foi aferido com metanol. A partir desta solução estoque, foi preparada uma solução de trabalho pipetando-se 10 mL da solução estoque em um balão volumétrico de 50 mL, aferindo-se o volume do balão com metanol. A solução obtida foi então filtrada em filtro de celulose regenerada com poros de 0,22 μ m, para eliminar a possível presença de ceras e outras impurezas que poderiam gerar problemas de separação cromatográfica.

3.3.2 Método cromatográfico para separação de humulonas e lupulonas por HPLC

Conforme descrito nos objetivos desta dissertação, antes de se iniciarem os testes de extração empregando-se HF-LPME, a separação dos analitos contidos no padrão ICE-3 foi realizada por HPLC em fase reversa (coluna XDB-C18, 4,6 $\times$ 250 mm e 5 μ m de partícula), empregando fase móvel composta por 85% de metanol e 15% água acidificada (1,5 mL de ácido fosfórico 85% em 102 mL de água ultra purificada Milli-Q), devidamente filtrada em membrana de celulose regenerada de 0,22 μ m e degaseficada em banho de ultrassom sob vácuo. O volume de injeção foi de 5 μ L, a vazão de fase móvel foi de 0,8 mL/min e o detector ajustado para 314 nm.

3.3.3 Procedimento de extração por HF-LPME

Na Figura 6 pode-se visualizar um esquema do procedimento de extração dos analitos por HF-LPME. O processo de extração consistiu em condicionar 6 cm da fibra previamente preparada com um loop no solvente de extração por 10 segundos. Após utilizar um papel para a retirada do excesso de solvente da fibra, o sistema foi preparado para extração dos analitos. Cabe relatar que o loop ajuda a elevar a altura da fibra com relação a barra de agitação, diminuindo a vibração causada pela rotação da mesma, evitando a perda de solvente do interior da fibra. É também conveniente mergulhar a fibra no solvente de extração antes de fazer o loop, esse procedimento faz com que a fibra fique mais maleável, e ajuda a evitar danos

mecânicos e oclusão do lume interno da fibra. Caso a fibra dobre e fique marcada no local da dobra, possivelmente ela ficará obstruída e por isso deve ser descartada e uma nova fibra deve ser preparada.

Figura 6 – Esquema ilustrativo das etapas de preparo da fibra e extração das humulonas e lupulonas por HF-LPME.

Fonte: autoria própria.

3.4 Otimização da extração de humulonas e lupulonas por HF-LPME

O processo de otimização da extração foi dividido em três etapas, consistindo em: i) otimização univariada para escolha do solvente capaz de extrair a maior quantidade de humulonas e lupulonas; ii) triagem de variáveis e a escolha dos parâmetros que afetam a extração; iii) otimização multivariada por delineamento composto central com as variáveis significativas obtidas na etapa anterior.

3.4.1 Procedimento para escolha do solvente de extração

A etapa de escolha do solvente de extração para HF-PLME foi realizada

pesando 60 mg de lúpulo da variedade cascade de um lúpulo comercial (contendo 6% de humulonas e 4,5% de lupulonas), previamente triturado, em frascos de 5 mL dotados de tampa com rosca e septo de PTFE/silicone. Sobre a amostra de lúpulo foram adicionados, volumetricamente, 5 mL de água ultrapurificada e 0,1 mL de solução 1 mol/L de HCl (para manter o pH do meio em 1,5) mantendo a agitação do sistema em 500 rpm por 2 minutos. A fibra oca foi preparada com auxílio de uma microseringa de 100 µL. A fibra contendo 20 µL do solvente foi mergulhada nos frascos de extração permanecendo sob agitação de 500 rpm em temperatura ambiente por trinta minutos. Após este período, o solvente extrator foi coletado e transferido para um vial dotado de um insert de 100 µL e a amostra foi injetada no HPLC. Para esta etapa foram testados os solventes: hexano, ciclohexano, heptano, tolueno, 1-octanol e éter diexílico.

3.4.2 Procedimento para triagem de variáveis

Com objetivo de avaliar as variáveis com maior influência no sistema foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} utilizando-se uma matriz geradora do tipo I=1234 com os seguintes fatores: tempo de extração, velocidade de agitação, pH da fase doadora e adição de sal (NaCl). Estes fatores foram escolhidos nesta triagem, pois são descritos na literatura como os que mais podem afetar a extração por HF-LPME (MERIB & CARASEK, 2013). Na Tabela 3, é possível observar os fatores, níveis e domínio experimental investigados nesta etapa da pesquisa.

Tabela 3 – Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} para extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME.

Fatores	Codificação	-1	0	1
Tempo (min)	X1	8,0	19,0	30,0
Agitação (rpm)	X2	500	700	900
pH	X3	1,8	3,0	4,2
NaCl (g)	X4	0,05	0,10	0,150

Fonte: autoria própria.

3.4.3 Procedimento para Otimização do processo de extração.

A otimização da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo foi realizada através de um planejamento fatorial composto central. Para o cálculo dos valores dos pontos axiais, isto é $+\alpha$ e $-\alpha$, foi utilizada a equação: $\alpha = (2^k)^{1/4}$. Na Tabela 4 é possível observar os valores calculados das variáveis codificadas que foram

utilizados neste planejamento.

Tabela 4 – Fatores, níveis e domínio experimental para otimização multivariada da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME.

Fatores	Codificação	- α	-1	0	1	+ α
Tempo (min)	X1	28,0	29,0	30,0	31,0	32,0
Agitação (rpm)	X2	300	400	500	600	700
pH	X3	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0
NaCl (g)	X4	0,025	0,038	0,050	0,063	0,075

Fonte: autoria própria.

3.5 Validação

O método foi validado através da avaliação das figuras de mérito: linearidade, precisão, exatidão, limites de detecção e limites de quantificação seguindo a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017.

3.6 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software Statistica v.10 (STATSOFT, 2011).

4. Resultados e discussões

4.1 Separação cromatográfica das humulonas e lupulonas

Após a diluição do padrão certificado ICE-3, este foi injetado no HPLC sob as condições cromatográficas descritas no item 3.5. A separação obtida foi muito semelhante ao cromatograma fornecido na metodologia oficial da ASBC (2011), de modo que não foram necessárias modificações no método. Na figura 7 é possível visualizar a comparação do cromatograma obtido em nosso laboratório e o cromatograma descrito na metodologia da ASBC.

Figura 7 – Comparativo entre os cromatogramas de humulonas e lupulonas: A) descrito na no método da ASBC e B) obtido em nosso laboratório.

Fonte: autoria própria.

É importante ressaltar também que, embora existam cinco humulonas e cinco lupulonas, na metodologia oficial de referencia, isto é, da ASBC (2011), consideram-se apenas quatro bandas no cromatograma, isto é, duas bandas para humulonas (cohumulona e N + adhumulona) e duas bandas para lupulonas (colupulona e N + adlupulona). Ou seja, a segunda e a quarta banda correspondem a quantificação aos pares, sendo assim, foi decidido não otimizar a separação destes analitos pois, quando fosse hora de comparar os resultados que obtivemos com nosso método com os relatados na literatura, nesta última os resultados constam sempre como cohumulona, N+adhumulona, colupulona e N+adlupulona.

4.2 Escolha do Solvente

A otimização univariada para escolha do solvente capaz de extrair os analitos do lúpulo em maior quantidade foi realizada com seis diferentes solventes: hexano, ciclohexano, heptano, tolueno, 1-octanol e éter diexílico. Todas as extrações foram

realizadas em triplicata, e então foram calculadas as médias, desvio-padrão e coeficiente de variação para a área do cromatograma de cada composto em cada solvente e, em seguida, foi realizada análise estatística dos resultados utilizando o software de análise de dados Statistica v.10. Os resultados, em termos de área bruta de cada composto no cromatograma e as análises estatísticas por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$) podem ser observados na Figura 8.

Figura 8 – Resultados da escolha de solventes para extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas significativas por ANOVA e Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: autoria própria.

Para a cohumulona, pode-se observar que o ciclohexano foi o solvente mais eficiente em extrair este analito e, conseqüentemente, o solvente que forneceu a maior área para este composto no cromatograma. O mesmo aconteceu com os compostos n+adhumulona. Para o grupo das lupulonas é possível se observar que o tolueno, seguido do ciclohexano foram os solventes mais efetivos para extração tanto da colupulona quanto da n+adhumulona. No entanto não foram verificadas diferenças estatísticas significativas (ANOVA e Tukey a 95% de confiança) na

extração quando estes dois solventes foram comparados. Assim, optou-se pelo uso do ciclohexano como solvente de extração considerando-se o bom compromisso da eficiência deste solvente para extração tanto das humulonas quanto das lupulonas.

4.3 Triagem de variáveis que afetam a extração por HF-LPME

Após a escolha do solvente de extração foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} utilizando-se uma matriz geradora do tipo I=1234 com os fatores tempo de extração, velocidade de agitação, pH da fase doadora e adição de sal (NaCl). Com a finalidade de se estimar o erro puro do modelo nesta triagem, foram realizados cinco experimentos nos pontos centrais da matriz (Tabela 5).

Os resultados da triagem de variáveis para extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 5 – Fatores, níveis e resposta área total do cromatograma para o somatório dos picos correspondentes a humulonas e lupulonas no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

nº	Tempo (min)	Agitação (rpm)	pH	NaCl (g)	Área Total
1	-1	-1	-1	-1	2.090.225
2	1	-1	-1	1	9.354.567
3	-1	1	-1	1	2.992.057
4	1	1	-1	-1	3.001.771
5	-1	-1	1	1	3.930.095
6	1	-1	1	-1	21.939.383
7	-1	1	1	-1	5.791.575
8	1	1	1	1	10.873.764
9	0	0	0	0	3.916.338
10	0	0	0	0	5.042.580
11	0	0	0	0	4.348.570
12	0	0	0	0	3.879.819
13	0	0	0	0	4.744.169
14	0	0	0	0	4.204.915

Fonte: autoria própria.

Os resultados obtidos com o planejamento fatorial fracionário foram tratados com o software de análise de dados Statistica, a fim de se calcular os contrastes e também para se estimar o erro puro do modelo. Na Figura 9 pode ser observado o gráfico de Pareto no qual se encontram os contrastes significativos ($p=0,05$), ou seja, aqueles que afetam o processo de extração. Pode-se verificar que todos os contrastes testados foram significativos. A partir deste resultado foi possível construir um novo planejamento do tipo delineamento composto central, com objetivo de se otimizar a extração dos analitos por HF-LPME.

Figura 9 – Gráfico de Pareto com as variáveis significativas no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} .

Fonte: autoria própria.

O contraste da variável tempo de extração apresentou efeito significativo e positivo. Este resultado pode ser explicado observando-se que, a partir do contato entre a fase receptora e a fase doadora, é necessário um intervalo de tempo para se atingir o equilíbrio entre a concentração dos analitos entre a fase doadora e a fase receptora pelo equilíbrio $[HA]_{\text{doadora}} \rightleftharpoons [HA]_{\text{receptora}}$. Assim, este resultado indica que no intervalo de tempo entre 8 e 30 minutos de extração, o equilíbrio entre as fases ainda não havia sido estabelecido, e que este precisava ser encontrado nas próximas etapas desta pesquisa. Segundo relatam BASHEER; BALASUBRAMANIAN; LEE (2003), ocorre um grande aumento na contração dos analitos na fase extratora até que se alcance uma situação de platô na qual o equilíbrio é estabelecido (BASHEER; BALASUBRAMANIAN; LEE, 2003). Assim definiu-se para a próxima etapa da otimização da extração que o valor da variável axial em $+\alpha$ seria de 32 minutos e em $-\alpha$ de 28 minutos, esses valores foram estabelecidos com o objetivo de não aumentar demasiadamente o tempo de

extração.

A variável velocidade de agitação teve um efeito significativo e negativo, indicando que um aumento da velocidade de agitação leva a uma diminuição da extração dos analitos de interesse. Uma possível explicação para este fato é que o aumento da velocidade de agitação pode levar a uma diminuição do tempo de contato do analito com a fase extratora diminuindo assim a quantidade de analito extraída. Em função deste resultado, para a etapa posterior do planejamento experimental foram definidas as seguintes velocidades de agitação: 700 rpm para o ponto axial + α e 300 rpm para o ponto axial - α .

Quanto ao efeito da variável pH, observou-se um efeito significativo e positivo, ou seja, um aumento no pH da fase doadora implica em um aumento da extração dos analitos. De acordo com a literatura (SHEN; HIAN, 2002), em geral analitos ácidos exigem que se trabalhe com valores de pH baixos na fase doadora, uma vez que o coeficiente de distribuição (D) para estes analitos varia de acordo com o pH. Assim o coeficiente de distribuição D pode ser definido pela equação:

$$D = \frac{K_d[H^+]}{K_a + [H^+]} \quad (14)$$

Onde K_a é a constante de ionização ácida, $[H^+]$ é a concentração de H^+ na fase doadora no equilíbrio e, K_d é o coeficiente de partição do analito entre a fase doadora aquosa e a fase receptora orgânica. Através desta equação, pode-se observar que a fração $\frac{[H^+]}{K_a + [H^+]}$ é sempre menor ou igual a 1 e, desta forma, apenas em valores elevados da concentração hidrogeniônica o valor do coeficiente de distribuição D deve igualar do valor de K_d . Neste sentido, o resultado esperado no experimento de triagem foi contrário à observação experimental, isso pode ser entendido quando se observa a relação entre a solubilidade da humulona em função do pH. SPETSIG et al., (1955) determinaram as constantes de solubilidade, constantes de ionização e a solubilidade intrínseca do ácido humulínico, da humulona e da lupulona em 25 °C e 40 °C, e construíram um diagrama que explica a solubilidade destes compostos em função do pH do meio (SPETSIG et al., 1955) conforme a seguinte equação:

$$S_{tot} = S_{HA} + \frac{K_s}{a_{H^+} \gamma_{A^-}} \quad (15)$$

Onde: S_{tot} é a solubilidade total, S_{HA} é a solubilidade intrínseca do analito, K_s é o produto de solubilidade, a_{H^+} é a atividade dos íons hidrogênio e γ_{A^-} é o coeficiente de atividade do analito ionizado.

Na Figura 10 é possível se observar o diagrama com os valores de solubilidade da humulona em função do pH, enquanto que na Tabela 6 é possível observar os valores de solubilidade calculada para este mesmo composto em função do pH do meio. O analito presente no lúpulo deve primeiramente se solubilizar na solução doadora antes de estabelecer um equilíbrio com a fase receptora. Assim, valores de pH baixos fazem com que o equilíbrio $\text{HA} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^-$ fique deslocado no sentido de formação dos reagentes, diminuindo a solubilidade do analito na fase doadora e, possivelmente aumentando o tempo necessário para estabelecer o equilíbrio entre as fases doadora e receptora. Desta forma, para a etapa posterior do planejamento experimental foi definido como 7 o valor de pH para o ponto axial + α , e 3 para o pH no ponto axial - α . Ainda vale ressaltar que as humulonas podem sofrer uma série de reações quando expostas a valores de pH muito alcalinos e, por isso, estes valores foram evitados neste estudo.

Tabela 6 – Valores de solubilidade calculada em mg L^{-1} em função do pH para a humulona.

pH	Solubilidade (mg L^{-1})
1	6,02
2	6,05
3	6,38
4	9,64
5	42,26
6	3.68,47
7	3.630,61

Fonte: Autoria própria

Figura 10 – Diagrama de solubilidade da humulona, lupulona e do ácido humulínico em função do pH.

Fonte: adaptado de BRIGGS, 2004.

A variável concentração de NaCl foi significativa e negativa, ou seja, aumentos na quantidade de NaCl implicam em uma menor extração dos analitos. Os efeitos da adição de NaCl para extração de humulonas e lupulonas estão relacionados ao aumento da força iônica da solução aquosa. Este efeito, conhecido como efeito “salting-out” é mais recomendável para analitos mais polares, o que não é o caso das humulonas e lupulonas. Além disso, alguns problemas podem ocorrer devido à adição de NaCl em extrações por HF-LPME como, por exemplo, o aumento da viscosidade da solução doadora, que pode dificultar a transferência de massa entre as fases pela redução da mobilidade dos analitos (PSILLAKIS & KALOGERAKIS, 2003). Da mesma forma, a interação dos íons com os analitos pode diminuir a

tendência dos analitos em migrar para a fase receptora. Em função disso, para a etapa posterior do planejamento experimental a quantidade de NaCl foi estabelecida em 0,075 g para o ponto axial + α , e de 0,025 g para o ponto axial - α .

4.4 Planejamento composto central para extração

A otimização da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo foi realizada através de um planejamento composto central. Na Tabela 7 podem ser observados os resultados obtidos.

Tabela 7 – Fatores e níveis codificados e respostas obtidas para otimização multivariada da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME.

nº	Tempo (min)	Agitação (rpm)	pH	Adição de sal (g)	Área total
1	-1	-1	-1	-1	5.073.529
2	1	-1	-1	-1	3.824.969
3	-1	1	-1	-1	5.966.417
4	1	1	-1	-1	4.253.927
5	-1	-1	1	-1	16.578.082
6	1	-1	1	-1	13.955.642
7	-1	1	1	-1	20.980.581
8	1	1	1	-1	27.456.093
9	-1	-1	-1	1	4.079.707
10	1	-1	-1	1	4.164.443
11	-1	1	-1	1	6.006.256
12	1	1	-1	1	4.442.025
13	-1	-1	1	1	22.439.471
14	1	-1	1	1	22.147.419
15	-1	1	1	1	18.902.745
16	1	1	1	1	23.763.582
17	-2	0	0	0	11.630.720
18	2	0	0	0	13.454.836
19	0	-2	0	0	8.139.008
20	0	2	0	0	18.448.089
21	0	0	-2	0	2.715.892
22	0	0	2	0	13.227.867
23	0	0	0	-2	14.454.962
24	0	0	0	2	15.313.896
25	0	0	0	0	13.243.842
26	0	0	0	0	13.321.136
27	0	0	0	0	11.544.470
28	0	0	0	0	10.877.960
29	0	0	0	0	14.730.031

Fonte: autoria própria.

A partir dos resultados da Tabela 6 foi possível gerar um modelo matemático que descreve as superfícies de resposta que permitem visualizar as condições de extração de humulonas e lupulonas por HF-LPME em cada experimento realizado. A equação encontrada foi: $Y=12743488 + 1671939X_2 + 6226512X_3 - 1096398X_3^2 - 1183827X_2X_4$.

Na figura 11, pode ser observado o gráfico de Pareto com os efeitos significativos do modelo matemático a $p=0,05$. É possível observar que, neste planejamento, apenas as variáveis pH, velocidade de agitação e a interação entre a velocidade de agitação e a quantidade de NaCl foram significativas.

A variável tempo de extração, que no experimento anterior de triagem de variáveis havia se mostrado significativo, agora no experimento de planejamento fatorial composto central deixou de ser significativo. Este fato pode ser explicado pela possibilidade de se ter atingido uma situação de platô na extração dos analitos na faixa de 28 a 32 minutos, de modo que alterações no tempo de extração, dentro dos níveis testados, não causam mais alterações significativas no processo de extração.

Figura 11 – Gráfico de Pareto com as variáveis significativas para otimização multivariada da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME.

Fonte: autoria própria.

A variável velocidade de agitação apresentou um efeito significativo e positivo indicando que, dentro do intervalo testado, um aumento na velocidade de agitação pode levar a uma melhora na transferência de massa da fase doadora para a fase receptora.

O efeito da variável pH foi significativo e positivo, vale lembrar que o valor do coeficiente de distribuição diminui com o aumento do valor de pH, o valor positivo do efeito do pH pode ser explicado pelo enorme aumento na solubilidade das humulonas e lupulonas que quando estimada para humulona em pH 3 é de aproximadamente 6 mg/L, e de 3600 mg/L em pH 7.

O efeito da adição de NaCl não foi significativo, dentro dos limites investigados neste planejamento, entretanto, vale ressaltar que existe uma interação significativa entre a velocidade de agitação e a quantidade de sal adicionada; e que este efeito é negativo, indicando um possível aumento na viscosidade do meio, que somada a um aumento na velocidade de agitação pode acabar dificultando o processo de transferência de massa dos analitos da fase doadora para a fase receptora.

Além disso, com base nos resultados da Tabela 6, foi possível gerar as superfícies de resposta para os efeitos significativos com o objetivo de visualizar os efeitos e as interações entre os efeitos que afetam a extração do sistema.

Por exemplo, na Figura 12 pode ser observado o gráfico de contorno obtido considerando-se as variáveis agitação (rpm) e pH. Enquanto que, na Figura 13 pode ser observado o gráfico de contorno obtido considerando-se as variáveis adição de NaCl (g) e agitação (rpm). Finalmente, na Figura 14 é possível observar o gráfico de contorno para as variáveis pH e tempo (min).

Figura 12 – Gráfico de contorno das variáveis significativas pH e agitação (rpm) para otimização multivariada da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME. (Apresentando valores codificados de agitação e pH).

Fonte: autoria própria.

Figura 13 – Gráfico de contorno das variáveis agitação (rpm) e adição de NaCl (g) para otimização multivariada da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME. (Apresentando valores codificados de quantidade de adição de sal e agitação).

Fonte: autoria própria.

Figura 14 – Gráfico de contorno das variáveis Tempo e pH para otimização multivariada da extração de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME. (Apresentando valores codificados de pH e Tempo).

Fonte: autoria própria.

Desta forma as melhores condições para realizar a extração das humulonas e lupulonas em lúpulo foram: 32 minutos, agitação em 700 rpm, pH 7 e 0,025 g de NaCl.

Na Tabela 8 é possível observar os resultados de ANOVA para o modelo que descreve as superfícies de resposta deste planejamento.

Tabela 8 – Tabela anova do modelo obtido pelo planejamento experimental para otimização do processo de extração.

ANOVA	SQ	gl	MQ	F_{calc}	F_{tab}	F_{calc}/F_{tab}
Regressão	1,11E+15	14	7,95E+13	5,00	2,48	2,01
Resíduos	2,23E+14	14	1,59E+13			
Falta de ajuste	2,13E+14	10	2,13E+13	9,03	5,96	1,51
Erro puro	9,45E+12	4	2,36E+12			
Total SS	1,34E+15	28				
R²	0,8332					

É possível observar que a significância estatística da regressão, calculada pela

razão entre a média dos quadrados da regressão e a média dos quadrados dos resíduos foi de 5,00. E que comparando-se o valor de F calculado ao valor de F tabelado, a 95% de confiança, encontra-se o valor de 2,48. Ou seja, o valor de F calculado é maior que o valor de F tabelado e, portanto, a variabilidade da resposta pode ser explicada pelas variáveis observadas, o que revela que o modelo obtido é significativo.

Por outro lado, é possível observar que o modelo obtido apresentou falta de ajuste, o que impossibilita de utilizar o modelo matemático obtido para fazer previsões. Este fato foi verificado ao se comparar a razão da média quadrática da falta de ajuste com a média quadrática do erro puro. Neste caso, o valor do teste de F calculado foi 9,03; enquanto o valor de F tabelado, a 95% de confiança, foi de 5,96, indicando a falta de ajuste do modelo.

4.5 Resultados da validação

Para verificar a linearidade do método foi construída uma curva de calibração externa utilizando o padrão certificado ICE-3 em metanol. Na Tabela 9 é possível observar os coeficientes de correlação, determinação, faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação para as curvas de calibração em metanol das humulonas e lupulonas. Enquanto que, nas Figuras 15 a 18 é possível observar as curvas de calibração externas com as equações da reta e coeficientes de determinação para cada analito.

Tabela 9 – Valores dos coeficientes de correlação, determinação, faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação para as curvas de calibração externa das humulonas e lupulonas.

Analito	r	R ²	Faixa linear (mg/L)	LD (mg/L)	LQ (mg/L)
Cohumulona	0,9999	0,9997	383,6; 808,5; 1233,4; 1658,3; 2083,2	35,2	117,2
N+adhumulona	0,9995	0,9991	850,0; 1791,7; 2733,3; 3675,0; 4616,7	139,4	464,8
Colupulona	0,9989	0,9979	271,7; 540,5; 788,5; 1020,7; 1261,7	58,6	195,5
N+adlupulona	0,9991	0,9983	219,1; 435,9; 635,9; 823,3; 1017,7; 1263,2	49,7	165,8

Figura 15 – Curva de calibração externa da Cohumulona.

Fonte: autoria própria.

Figura 16 – Curva de calibração externa da n+adhumulona.

Fonte: autoria própria.

Figura 17 – Curva de calibração externa da Colupulona

Fonte: autoria própria.

Figura 18 – Curva de calibração externa da n+adlupulona.

Fonte: autoria própria.

Suspeitando-se da existência de efeito matriz, também foram construídas

curvas de calibração em uma amostra de lúpulo isenta dos analitos de interesse. Para isso, foram triturados e misturados lúpulos comerciais das seguintes variedades Cascade, Galaxy, Centennial, Nugget e Saaz; de modo a se obter um pool de amostra com os lúpulos comerciais mais comuns. Uma alíquota de 5 g desta mistura foi então submetida à extração com metanol por 16 horas em soxhlet para eliminar exaustivamente as humulonas e lupulonas do pool. A amostra resultante foi seca em temperatura ambiente e submetida ao processo de extração com HF-LPME para confirmar que não existiam humulonas e lupulonas remanescentes.

A curva de calibração foi construída dopando-se esta amostra com o padrão certificado ICE-3 com quantidades de humulonas e lupulonas usualmente encontradas em lúpulos comerciais (6-30% (m/m)). Para isso, pesaram-se 0,563 g do padrão em um balão de 1 mL (solução estoque), completando-se o volume com metanol e utilizando-se um banho de ultrassom para auxiliar na dissolução do padrão, a densidade desta solução foi calculada. Foi também utilizada uma balança analítica para pesagem da solução estoque em cada uma das dopagens. Este procedimento se fez necessário, devido à alta viscosidade da solução estoque que dificultava a transferência do volume da pipeta para a amostra durante a dopagem. A partir da massa de padrão adicionada foram calculadas as concentrações individuais dos pontos da faixa linear. Os valores obtidos para os coeficientes de correlação, determinação, faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação para a extração na amostra são apresentados na Tabela 10. Enquanto que nas Figuras 19 a 22 é possível observar as curvas de calibração na matriz com as equações da reta e coeficientes de determinação para cada analito investigado.

Tabela 10 – Valores dos coeficientes de correlação, determinação, faixa linear, limite de detecção e limite de quantificação para extração na amostra.

Analito	r	R²	Faixa linear (%*)	LD (%*)	LQ (%*)
Cohumulona	0,9999	0,9998	1,59; 2,72; 3,94; 5,37; 6,52	0,09	0,31
N+Adhumulona	0,9999	0,9997	3,52; 6,02; 8,74; 11,90; 14,46	0,25	0,83
Colupulona	0,9887	0,9775	1,54; 2,63; 3,82; 5,20; 6,32	0,97	3,23
N+adlupulona	0,9808	0,9620	1,24; 2,12; 3,08; 4,19; 5,10	1,03	3,42

* As porcentagens são referentes à concentração % (m/m) de cada analito adicionado na amostra.

Figura 19 – Curva de calibração da cohumulona na amostra fortificada.

Fonte: autoria própria.

Figura 20 – Curva de calibração da N+adhumulona na amostra fortificada.

Fonte: autoria própria.

Figura 21 – Curva de calibração da colupulona na amostra fortificada.

Fonte: autoria própria.

Figura 22 – Curva de calibração da N+adlupulona na amostra fortificada.

Fonte: autoria própria.

Como estes resultados foram muito diferentes dos obtidos pelo uso da curva de calibração externa (em solvente), possivelmente existe algum fator não controlado estava afetando as determinações de lupulonas nas amostras.

A tabela de ANOVA para os resultados das curvas de calibração dos analitos são apresentadas nas tabelas 11 a 14.

Tabela 11 – Tabela ANOVA da regressão linear da cohumulona na matriz fortificada.

Cohumulona	gl	SQ	MQ	F_{calc}	F_{tab}	F_{calc}/F_{tab}
Regressão	1	1,94E+14	1,94E+14	671,58	4,67	143,89
Resíduo	13	3,76E+12	2,89E+11			
Total	14	1,98E+14				

Fonte: autoria própria.

Tabela 12 – Tabela ANOVA da regressão linear da n+adhumulona na matriz fortificada.

n+Adhumulona	gl	SQ	MQ	F_{calc}	F_{tab}	F_{calc}/F_{tab}
Regressão	1	1,18E+15	1,18E+15	355,37	4,67	76,14
Resíduo	13	4,31E+13	3,32E+12			
Total	14	1,22E+15				

Fonte: autoria própria.

Tabela 13 – Tabela ANOVA da regressão linear da colupulona na matriz fortificada.

Colupulona	gl	SQ	MQ	F_{calc}	F_{tab}	F_{calc}/F_{tab}
Regressão	1	1,03E+13	1,03E+13	48,98	4,67	10,49
Resíduo	13	2,73E+12	2,10E+11			
Total	14	1,30E+13				

Fonte: autoria própria.

Tabela 14 – Tabela ANOVA da regressão linear da n+adlupulona na matriz fortificada.

n+Adlupulona	gl	SQ	MQ	F_{calc}	F_{tab}	F_{calc}/F_{tab}
Regressão	1	8,90E+12	8,90E+12	53,92	4,67	11,55
Resíduo	13	2,15E+12	1,65E+11			
Total	14	1,10E+13				

Podemos observar pelos resultados de ANOVA que, para todos os analitos, o valor do teste F_{calc} foi superior ao valor do teste F_{tab} . Este resultado indica que não há evidências de que o valor do coeficiente angular das curvas dos analitos seja igual à zero, o que nos indica que existe uma relação linear entre as concentrações na

amostra e o sinal gerado no detector.

Pode-se também observar que o valor de R^2 para as humulonas foi superior a 0,999, o que é um bom indício de que existe uma relação linear e proporcional entre a concentração dos analitos e o sinal gerado no detector. Entretanto, para as lupulonas o valor de R^2 foi inferior a 0,99, este resultado indica uma linearidade não adequada para estes analitos.

Na Tabela 15 são apresentados os valores dos coeficientes angular e linear, bem como seus respectivos erros para os analitos investigados. Verifica-se que o erro dos coeficientes angular e linear das lupulonas é substancialmente menor que os coeficientes angulares para as humulonas, demonstrando que o método desenvolvido é mais sensível para humulonas do que para lupulonas.

Tabela 15 – Valores dos coeficientes angular e linear e os seus respectivos erros para humulonas e lupulonas.

Analito	Coef ang	Erro Coef ang	Coef Lin	Erro Coef Lin
cohumulona	2030177	14298	1042504	62945
N+adhumulona	2256835	19099	9536030	186326
colupulona	482366	36570	2085569	155887
N+adlupulona	556371	55317	1312372	190188

As figuras de mérito de precisão intra-corrida e inter-corrida foram também avaliadas na amostra fortificada, em 3 dias distribuídos ao longo de duas semanas, para cada dia foram realizadas triplicatas em três concentrações distintas dentro da faixa de trabalho estabelecida na curva de calibração. As concentrações em porcentagem (m/m) de analito na amostra para os pontos alto, médio e baixo podem ser visualizadas na Tabela 16.

Tabela 16 – Concentração dos analitos em porcentagem na amostra (%m/m) para os pontos baixo, médio e alto para precisão e exatidão para o método de extração de alfa e beta ácidos de lúpulo por HF-LPME.

Concentração	Cohumulona	N+adhumulona	Colupulona	N+adlupulona
Ponto Alto	6,02 %	13,34 %	5,83 %	4,70 %
Ponto médio	4,15 %	9,20 %	4,02 %	3,24 %
Ponto Baixo	2,26 %	5,02 %	2,19 %	1,77 %

A precisão intra-corrida expressa o grau de concordância entre resultados dentro de um mesmo dia; os resultados de precisão intra-corrida podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17 – Resultados de precisão intra-corrida para o método de determinação de humulonas e lupulonas por HF-LPME e HPLC.

Analito	Dia 1 (CV%)			Dia 2 (CV%)			Dia 3 (CV%)		
	PA	PM	PB	PA	PM	PB	PA	PM	PB
Cohumulona	8,70	10,04	12,68	6,55	8,86	6,89	10,16	6,55	18,93
N+Adhumulona	16,28	14,81	6,11	13,81	13,58	9,31	11,71	4,43	19,50
Colupulona	5,35	24,21	28,87	9,67	10,56	12,69	16,31	9,14	39,79
N+Adlupulona	5,97	25,97	37,40	21,96	17,45	15,96	21,20	10,03	35,77

Legenda: PA = Ponto Alto; PM = Ponto Médio; PB = Ponto Baixo.

A precisão inter-corrida expressa o grau de concordância entre resultados entre os diferentes dias e seus resultados podem ser visualizados Tabela 18.

Tabela 18 – Resultados de precisão inter-corrida para o método de extração de alfa e beta ácidos de lúpulo por HF-LPME.

Analito	CV%PA	CV%PM	CV%PB
Cohumulona	0,89	4,30	5,56
N+Adhumulona	2,17	6,83	1,13
Colupulona	16,57	15,65	12,05
N+Adlupulona	18,63	16,89	16,49

Legenda: PA = Ponto Alto; PM = Ponto Médio; PB = Ponto Baixo

Para a precisão intra-corrida utilizou-se como critério de aceitação um coeficiente de variação de até 20% em relação à variação da resposta. As Tabelas 15 e 16 revelam que a variação das respostas para as humulonas foi inferior ao critério de aceitação para todos os pontos em todos os dias, entretanto, as concentrações de lupulonas apresentaram variação, em alguns casos, muito acima do aceitável. Este resultado com as lupulonas já poderia ser esperado considerando os resultados de linearidade e limites de quantificação. Vale ressaltar que ainda assim o coeficiente de variação das lupulonas neste caso foi substancialmente superior ao das humulonas.

Utilizando os resultados de precisão foi calculada também a eficiência de extração. Vale ressaltar, que a equação para o cálculo de eficiência de extração, utiliza como princípio a existência de um equilíbrio dinâmico entre a fase doadora e a fase receptora. O sistema utilizado neste caso apresenta um segundo equilíbrio entre os analitos presentes no lúpulo e a solução doadora. Portanto, o conceito utilizado para este cálculo foi adaptado considerando-se a quantidade total de analito não dissolvido no início da extração em relação à quantidade de analito

extraído na fase receptora.

Para o cálculo da quantidade de analito extraído, com relação à quantidade total de analito, foram utilizadas as curvas de calibração externas aplicadas na resposta fornecida nos resultados de precisão. Os resultados de eficiência de extração são apresentados na Tabela 19 e são expressos em porcentagem de analito extraído em relação à quantidade total.

Tabela 19 – Resultados eficiência de extração para o método de extração de alfa e beta ácidos de lúpulo por HF-LPME (% em g de analito extraído por 100g de amostra).

Concentração	Cohumulona	N+adhumulona	Colupulona	N+adlupulona
Ponto alto	0,77 ± 0,05%	1,08 ± 0,10%	1,03 ± 0,14%	0,69 ± 0,12%
Ponto médio	0,75 ± 0,06%	1,11 ± 0,09%	1,29 ± 0,16%	0,92 ± 0,15%
Ponto Baixo	0,86 ± 0,09%	1,45 ± 0,10%	1,76 ± 0,25%	1,21 ± 0,23%

Pode-se observar na Tabela 17 que a eficiência de extração foi relativamente baixa para todos os casos. Pode-se levantar a hipótese de que a quantidade de analito no início da extração era relativamente alta, saturando a fase receptora com uma quantidade pequena de analito extraída. Esta hipótese pode ser sustentada principalmente para o analito n+adhumulona e para as lupulonas onde podemos observar que concentrações menores de analito forneceram maiores eficiências de extração.

A exatidão foi calculada comparando-se o valor de porcentagem retornado pelo método de extração com o valor esperado obtido a partir do cálculo da dopagem da amostra e o resultado foi expresso em % de recuperação e pode ser visualizado na tabela 20.

Tabela 20 – Resultados de exatidão do processo de extração de alfa e beta ácidos de lúpulo por HF-LPME.

Analito	Dia 1			Dia 2			Dia 3		
	PA	PM	PB	PA	PM	PB	PA	PM	PB
Cohumulona	97,2%	90,0%	88,8%	99,9%	94,6%	96,8%	93,2%	86,3%	95,6%
N+Adhumulona	100,7%	88,9%	90,2%	99,1%	91,6%	89,0%	92,9%	79,7%	86,2%
Colupulona	170,2%	191,3%	193,1%	174,4%	202,7%	227,5%	100,8%	149,1%	135,9%
N+Adlupulona	178,1%	218,1%	204,7%	151,5%	205,9%	260,0%	96,9%	149,5%	165,5%

Legenda: PA = Ponto Alto; PM = Ponto Médio; PB = Ponto Baixo.

O critério de aceitação para a resposta na exatidão foi entre 80% a 120% do valor esperado, para este método, podemos ver que as humulonas apresentaram

um desempenho aceitável, enquanto que as lupulonas revelaram uma resposta pouco exata.

Foram então realizadas extrações e determinações de lúpulos comerciais utilizando o método internacional da ASBC (ASBC, 2010) para determinação de humulonas e lupulonas em lúpulo, e o resultado foi comparado com os resultados obtido com HF-LPME e HPLC. O grau de concordância entre os métodos, expresso em % da resposta do método proposto em relação ao método internacional pode ser visualizado na tabela 21.

Tabela 21 – Comparação entre resultados do método internacional e HF-LPME.

	Cohumulona	N+Adhumulona	Colupulona	N+Adlupulona
Cascade	95,6%	37,0%	66,5%	80,5%
Galaxy	158,8%	142,7%	94,9%	99,7%
Nugget	115,6%	104,5%	57,4%	101,7%

Pode-se verificar que nas amostras de lúpulo comerciais os valores de recuperação obtidos não foram satisfatórios. O lúpulo cascade obteve um valor de cohumulona satisfatório, entretanto o resultado de n+adhumulona foi menor que o esperado. No lúpulo Galaxy, os valores encontrados para as humulonas foram maiores do que os valores obtidos pelo método de referência, e para o lúpulo da variedade Nugget, os resultados foram aceitáveis. Como mencionado anteriormente, devido aos valores de limite de quantificação das lupulonas serem altos, os valores de resposta obtidos possuem pouca confiança analítica, entretanto se mostraram mais próximos da resposta do valor de referência se comparados às humulonas.

4.6 Avaliação do nível de verdura das metodologias

Utilizando a Tabela 1 apresentada na introdução desta dissertação, foi possível calcular os pontos de penalidade para o método de referência a fim de compará-lo com o método por HF-PLME para avaliar o ganho no nível de verdura. A Tabela 22 apresenta as pontuações de penalidade apresentadas pelo preparo de amostra do método de referência. Enquanto a Tabela 23 apresenta as pontuações de penalidade apresentadas pelo método proposto.

Podemos observar que o método de referência possui duas vezes mais pontos de penalidade do que o método proposto utilizando HF-LPME, além de não possuir etapas de filtração que aumentam o risco de erros durante a operação.

Tabela 22 – Penalidades para o método de referência da ASBC.

Reagentes	Penalidade
- HCl (40mL)	6
- Metanol (20mL) + (50mL)	10
- Éter etílico (100mL)	9
Instrumental	
- Energia <1,5kWh por hora por amostra	1
- Risco ocupacional: Emissão de vapores	3
- Resíduos gerados	5
- Sem tratamento	3
Total	37

Tabela 23 – Penalidades para o método proposto utilizando HF-LPME.

Reagentes	Penalidade
- Ciclohexano (20uL)	8
Instrumental	
- Energia <1,5kWh por hora por amostra	1
- Risco ocupacional: Emissão de vapores	3
- Resíduos gerados	3
- Sem tratamento	3
Total	18

Empregando os critérios para avaliação dos métodos podemos observar que a pontuação total do método de referência é de 63, o que indica um método ainda aceitável do ponto da química analítica verde. Por outro lado, método de preparo de amostras por HF-LPME apresentou uma pontuação final de 82 sendo, o que indica um excelente nível verdura segundo os preceitos da química analítica verde.

5. Conclusões

Nesta pesquisa, buscou-se desenvolver um novo método de preparo de amostras para determinação de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME e HPLC. As melhores condições para extração dos analitos dentro dos limites estabelecidos foram obtidas por metodologia de superfície de resposta e são: 20 µL de ciclohexano como solvente de extração, tempo de extração de 32 minutos, agitação de 700 rpm, pH 7 e 0,025 g de NaCl. O novo método reduziu em cerca de seis mil vezes a quantidade de solvente orgânico empregado no preparo das

amostras, e apresentou a metade das penalidades observadas quando comparado ao método de referência não miniaturizado.

Os parâmetros de validação linearidade e precisão foram avaliados para o novo método de preparo de amostras para determinação de humulonas e lupulonas em lúpulo por HF-LPME e mostraram-se adequados para humulonas, porém o mesmo não foi comprovado para lupulonas.

Ao se comparar os resultados das análises quantitativas de humulonas e lupulonas por HF-LPME com as metodologias não miniaturizadas verificou-se resultados pouco satisfatórios com a primeira, tanto para humulonas como para lupulonas.

Sugere-se a continuidade desta pesquisa para verificar a influência do efeito matriz na determinação dos analitos e também a possibilidade do uso de método de adição padrão para cada variedade de lúpulo a ser analisada, na tentativa de minimizar o efeito da matriz na quantificação de humulonas e lupulonas em amostras de lúpulo.

Referencias

ALAHMAD, W.; TUNGKIJANANSIN, N.; KANETA, T.; VARANUSUPAKUL, P. A colorimetric paper-based analytical device coupled with hollow fiber membrane liquid phase microextraction (HF-LPME) for highly sensitive detection of hexavalent chromium in water samples. *Talanta*, v. 190, n. July, p. 78–84, 2018.

ALMAGUER, C.; SCHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 120, n. 4, p. 289–314, 2014.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. *Green chemistry : theory and practice*. Oxford Uni ed. New York.

ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; DE LA GUARDIA, M. Green analytical chemistry. In: *Green Chemistry Research Trends*. v. 27,n. 6, 2008

American Society of Brewing Chemists, Hops 14. α -Acids and β -Acids in Hops and Hop Extracts by HPLC, 2010, doi: 10.1094/ASBCMOAHops-14.

ASENSIO-RAMOS, M. RAVELO-PÉREZ, L. M.; GONZÁLEZ-CURBELO, M. Á.; HERNÁNDEZ-BORGES, J. Liquid phase microextraction applications in food analysis *Journal of Chromatography A*, v. 1218 p. 7415-7437, 2011.

BASHEER, C.; BALASUBRAMANIAN, R.; LEE, H. K. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1016, p. 11-20, 2003.

BAXTER, E. D.; HUGHES, P. S. *Beer : Quality, safety and nutritional aspects*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001.

BOCQUET, L.; SAHPAZ, S.; HILBERT, J. L.; RAMBAUD, C.; RIVIÈRE, C. *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. *Phytochemistry Reviews*, v. 17, n. 5, p. 1047–1090, 2018.

BRASIL, 2017 - Ministério da Saúde - Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ Diretoria Colegiada; Resolução Nº 166, de 24 de Julho de 2017. Publicado no Diário Oficial da União, Nº 141, 25/07/2017, disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=25/07/2017&jornal=1>

&pagina=88&totalArquivos=128, acessado em janeiro de 2019.

BRASIL. Decreto nº 6871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. MAPA – Ministério da Agricultura e abastecimento. Diário Oficial da União Seção 1-5 5/6/2009, Página 20 (Publicação Original).

BRUNDTLAND, G. H. Our Common Future: Report of the World Commission on Environment and Development. *Medicine, Conflict and Survival*, v. 4, n. 1, p. 300, 1987.

BURNS, C. S. HEYERICK, A.; DE KEUKELEIRE, D.; E., FORBES MALCOLM D. Mechanism for Formation of the Lightstruck Flavor in Beer Mechanism for Formation of the Lightstruck Flavor in Beer Revealed by. *Chemistry—A European Journal*, v. 7, n. 21, p. 4553–4561, 2001.

CAI, J. CHEN, G.; QIU, J.; JIANG, R.; ZENG, F.; ZHU, F. Hollow fiber based liquid phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in ecological textiles by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, v. 146, p. 375–380, 2016.

CERVBRASIL. Anuário 2016. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuarios/CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf. Acesso em: 30-01-2019.

BRIGGS, D. E. et al. *Industry Food Processing - Brewing - Science and Practice.pdf*.

CETESB - COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Emergências Químicas. Disponível em: <<https://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/emergencia/relatorio.php>>. Acesso em: 27 nov. 2019.

CLARKE, B. J.; HILDEBRAND, R. P. the Isomerization of Humulone. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 71, n. 3, p. 282–293, 1965.

ESRAFILI, A. BAHARFAR, M.; TAJIK, M.; YAMINI, Y.; GHAMBARIAN, M. Two-phase hollow fiber liquid-phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 108, p. 314–322, 2018.

FERNANDEZ, M. A. M.; ANDRÉ, L. C.; CARDEAL, Z. DE L. Hollow fiber liquid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry method to analyze bisphenol A and other plasticizer metabolites. *Journal of Chromatography A*, v. 1481, p. 31–36, 2017.

Gałaszka, Agnieszka; Konieczka, Piotr; Migaszewski, Zdzisław M.; Namies'nik, Jacek. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 37, p. 61 – 72, 2012.

GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; ESRAFILI, A. Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: Principles and applications. *Microchimica Acta*, v. 177, n. 3–4, p. 271–294, 2012.

GRØNHAUG HALVORSEN, T.; PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Reduction of extraction times in liquid-phase microextraction. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, v. 760, n. 2, p. 219–226, 2001.

HADI, H.; MAKAHLEH, A.; SAAD, B. Hollow fiber liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of trace mitiglinide in biological fluids. *Journal of Chromatography B*, v. 895–896, p. 131–136, 2012.

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

HEYERICK, A.; ZHAO, Y.; SANDRA, P.; HUVAERE, K.; ROELEN, F.; DE KEUKELEIRE, D. Photolysis of hop-derived *trans*-iso- α -acids and *trans*-tetrahydroiso- α -acids: Product identification in relation to the lightstruck flavour of beer. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v. 2, n. 3, p. 306–314, 2003.

INTELMAAN, D.; HOFMANN, T. On the autoxidation of bitter-tasting Iso- α -acids in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 8, p. 5059–5067, 2010.

JING, S. J.; LI, Q. L.; JIANG, Y. A new simultaneous derivatization and microextraction method for the determination of memantine hydrochloride in human

plasma. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 1008, p. 26–31, 2016.

KARABÍN, M.; HUDCOVÁ, T.; JELÍNEK, L.; DOSTÁLEK, P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 15, n. 3, p. 542–567, 2016.

KEUKELEIRE, D. D. E. et al. Beer Lightstruck Flavor: The Full Story. *Cerevisia*, v. 33 (3), n. March, 2008.

KOETTER, UWE; BIENDL, M. Hops (*Humulus lupulus*): A Review of its Historic and Medicinal Uses. *The Journal of American Botanical Council*, n. 87, p. 44–57, 2010.

KRULL, I.; SWARTZ, M. Method validation requirements and approaches in biotechnology. *LC-GC magazine of liquid and gas chromatography*. 1998, 16, 3, 258–263.

LUIZ, A. L.; VASCONCELOS SOARES MACIEL, E.; MAURO LANÇAS, F. Uma abordagem conceitual das técnicas miniaturizadas de preparo de amostra e suas aplicações na análise de resíduos e contaminantes em matrizes alimentares. *Scientia Chromatographica*, v. 7, n. 3, p. 157–182, 2015.

MALOWICKI, M. G.; SHELLHAMMER, T. H. Isomerization and Degradation Kinetics of Hop. v. 53, n. 11, p. 4434–4439, 2005.

MARCUSSO, E. F.; MÜLLER, C. V. ANUÁRIO DA CERVEJA NO BRASIL 2018: Crescimento e Inovação. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, n. 72, p. 6, 2019.

MENEZES, H. C.; PAULO, B. P.; PAIVA, M. J. N.; CARDEAL, Z. L. A Simple and Quick Method for the Determination of Pesticides in Environmental Water by HF-LPME-GC/MS. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, v. 2016, 2016.

MERIB, J.; CARASEK, E. Microextração em fase líquida suportada com fibra oca (HF-LPME): Fundamentos e aplicações recentes. *Scientia Chromatographica*, v. 5, n. 4, p. 249–262, 2013.

MURPHEY, S. M. J.; BURKHARDT, R. Iso- α -Acids in Beer by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 51, p. 3–4, 1993.

MURPHEY, S. M. J.; BURKHARDT, R.; DAVIS, N. Iso- α -Acids in Beer by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 51, 1992.

ORAV, A.; ARAK, E.; RAAL, A. Phytochemical analysis of the essential oil of *Achillea millefolium* L. from various European countries. *Natural Product Research*, v. 20, n. 12, p. 1082–1088, 2006.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography A*, v. 1184 p. 132-142, 2008.

PRADO, A. G. S. QUÍMICA VERDE, OS DESAFIOS DA QUÍMICA DO NOVO MILÊNIO. v. 26, n. 5, p. 738–744, 2003.

PSILLAKIS, E.; KALOGERAKIS, N. Developments in liquid-phase microextraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 22, n. 9, p. 565–574, 2003.

RANJBAR BANFORUZI, S.; HADJMOHAMMADI, M. R. Two-phase hollow fiber-liquid microextraction based on reverse micelle for the determination of quercetin in human plasma and vegetables samples. *Talanta*, v. 173, n. May, p. 14–21, 2017.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, 2004, 27, 5, 771-780.

RIDDHI, KUMBHAR; SHUCHI, DESAI. Green Analytical Chemistry and its Metrics – An Initiative for a Greener and Safer Tomorrow. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 55, n. 2, p. 24 – 31, 2019

SHEN, G.; HIAN, K. L. Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 3, p. 648–654, 2002.

SKENE, K. R. et al. *Myrica gale* L. *Journal of Ecology*, v. 88, n. 6, p. 1079–1094, 2000.

SOBHI, H. R. et al. Extraction of carbonyl derivatives from ozonated wastewater samples using hollow fiber liquid phase microextraction followed by gas chromatography-electron capture detection. *Microchemical Journal*, v. 148, n. February, p. 331–337, 2019.

SCHÖNBERGER, C.; KOSTELECKY, T. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, v. 117, n. 3, p. 259–267, 2011.

SHARPE, F. R.; ORMROD, I. H. L. FAST ISOMERISATION OF HUMULONE BY PHOTO-REACTION: PREPARATION OF AN HPLC STANDARD *Journal of the Institute of Brewing*, v. 97, p. 33–37, 1991.

SHEN, G.; HIAN, K. L. Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. *Analytical Chemistry*, v. 74, n. 3, p. 648–654, 2002.

SINDCERV. O setor em números. Disponível em: <<https://www.sindicerv.com.br/o-setor-em-numeros/>>. Acesso em: 10 set. 2019.

SKENE, K. R.; SPRENT, J. I.; RAVEN, J. A.; HERDMAN, L. *Myrica gale* L. *Journal of Ecology*, v. 88, n. 6, p. 1079–1094, 2000.

SOBHI, H. R.; BEHBAHANI, M.; GHAMBARIAN, M.; SALIMI, M.; ESRAFILI, A. Extraction of carbonyl derivatives from ozonated wastewater samples using hollow fiber liquid phase microextraction followed by gas chromatography-electron capture detection. *Microchemical Journal*, v. 148, n. February, p. 331–337, 2019.

SOUSA-AGUIAR, E. F.; DE ALMEIDA, J.; ROMANO, P. N.; FERNANDES, R. P.; CARVALHO, Y. QUÍMICA VERDE: A EVOLUÇÃO DE UM CONCEITO. *Química Nova*, v. 37, n. 7, p. 1257–1261, 2014.

SPETSIG, L.-O.; BJERRUM, J.; LUNDÉN, R.; PRYDZ, H. Electrolytic Constants and Solubilities of Humulinic Acid, Humulone, and Lupulone. *Acta Chemica Scandinavica*, V. 9, p.1421-1424,1955.

SPIETELUN, A.; MARCINKOWSKI, Ł.; DE LA GUARDIA, M.; NAMIEŚNIK, J. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques *Talanta*, V. 119, p. 34-45, 2014.

STATSOFT, I. StatisticaTulsa, USA, 2011. Disponível em: <www.statsoft.com>

STEENACKERS, B.; COOMAN, L. DE; VOS, D. DE. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer

properties and the brewing process : A review. Food Chemistry, v. 172, p. 742–756, 2015.

STEPHENSON, W. H.; BAMFORTH, C. W. The Impact of Lightstruck and Stale Character in Beers on their Perceived Quality: A consumer Study. Journal of the Institute of Brewing, v. 108, n. 4, p. 406–409, 2002.

TAJABADI, F.; GHAMBARIAN, M.; YAMINI, Y.; YAZDANFAR, N. Combination of hollow fiber liquid phase microextraction followed by HPLC-DAD and multivariate curve resolution to determine antibacterial residues in foods of animal origin. Talanta, v. 160, p. 400–409, 2016.

TANIGUCHI, Y.; MATSUKURA, Y.; OZAKI, H.; NISHIMURA, K.; SHINDO, K. Identification and quantification of the oxidation products derived from α -acids and β -acids during storage of hops (*Humulus lupulus* L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 61, n. 12, p. 3121–3130, 2013.

TSURUMARU, Y.; SASAKI, K.; MIYAWAKI, T.; UTO, Y.; MOMMA, T.; UMEMOTO, N.; MOMOSE, M.; YAZAKI, K.; HIPT-1, a membrane-bound prenyltransferase responsible for the biosynthesis of bitter acids in hops. Biochemical and Biophysical Research Communications, v. 417, n. 1, p. 393–398, 2012.

UREMBERG, N.; ERMANY, G. I NTERNATIONAL H OP G ROWERS ' C ONVENTION International Hop Growers ' Convention. 2018.

VAN HOLLE, A.; VAN LANDSCHOOT, A.; ROLDÁN-RUIZ, I.; NAUDTS, D.; DE KEUKELEIRE, D. The brewing value of Amarillo hops (*Humulus lupulus* L.) grown in northwestern USA: A preliminary study of terroir significance. Journal of the Institute of Brewing, v. 123, n. 3, p. 312–318, 2017.

VERZELE, M.; DE KEUKELEIRE, D. Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids. 1st Editio ed. Amsterdam: Elsevier Science publishers B.V., 1991.

VERZELE, M.; JANSEN, H. E.; FERDINANDUS, A. ORGANOLEPTIC TRIALS WITH HOP BITTER SUBSTANCES. Journal of the Institute of Brewing, v. 76, n. 1, p. 25–28, 1969.

VILLAR-NAVARRO, M.; RAMOS-PAYÁN, M.; FERNÁNDEZ-TORRES, R.; CALLEJÓN-MOCHÓN, M.; BELLO-LÓPEZ, M. Á. A novel application of three phase hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME) for the HPLC

determination of two endocrine disrupting compounds (EDCs), n-octylphenol and n-nonylphenol, in environmental waters. *Science of the Total Environment*, v. 443, p. 1–6, 2013.

YAMINI, Y.; REZAZADEH, M.; SEIDI, S. Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 112, p. 264–272, 2019.

ZHANG, P. et al. Analytical Methods Application of ionic liquids for liquid – liquid microextraction. *Analytical Methods*, n. September, p. 5376–5385, 2013.