

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E DA SAÚDE - CCENS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA**

CAMILA TAIANY DELFINO SILVA

**CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS DOS PRIMEIROS CULTIVARES DE LÚPULO
(*Humulus lupulus* L.) PRODUZIDOS NO BRASIL**

ALEGRE-ES

2019

CAMILA TAIANY DELFINO SILVA

**CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS DOS PRIMEIROS CULTIVARES DE LÚPULO
(*Humulus lupulus* L.) PRODUZIDOS NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agroquímica da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Agroquímica, na linha de pesquisa de Química Orgânica.

Orientadora: Patrícia Fontes Pinheiro
Coorientadores: Vanessa Moreira Osório
Alexandre Fontes Pereira

ALEGRE-ES

2019

S586c SILVA, CAMILA TAIANY, 1988-
CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS DOS PRIMEIROS
CULTIVARES DE LÚPULO (*Humulus lupulus* L.)
PRODUZIDOS NO BRASIL / CAMILA TAIANY SILVA. -
2019.
90 f. : il.

Orientadora: Patricia Fontes Pinheiro.

Coorientadora: Vanessa Moreira Osório.

Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, Naturais e
da Saúde.

1. Lúpulo Brasileiro. 2. Headspace. 3. HPLC. 4. *humulus
lupulus* L.. 5. Voláteis. 6. fitotoxicidade. I. Pinheiro, Patricia
Fontes. II. Osório, Vanessa Moreira. III. Universidade Federal do
Espírito Santo. Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde.
IV. Título.

CDU: 631.41

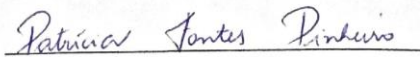
CAMILA TAIANY DELFINO SILVA

**CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS DOS PRIMEIROS CULTIVARES DE LÚPULO
(*Humulus lupulus* L.) PRODUZIDOS NO BRASIL**

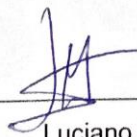
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Centro de Ciências Exatas, Naturais e da Saúde-CCENS, da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Agroquímica, linha de pesquisa em Química Orgânica.

Aprovada em 26 de fevereiro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Patrícia Fontes Pinheiro
(Orientadora)



Luciano Menini
(Membro interno ao PPGAQ)



Vanessa Moreira Osório
(Membro externo ao PPGAQ)

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

Agradeço à Universidade Federal do Espírito Santo pelo apoio logístico no desenvolvimento desse projeto e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica.

À minha Professora orientadora Patrícia Fontes Pinheiro pela oportunidade, apoio e confiança durante todo o tempo antes e durante este trabalho. Agradeço também a disponibilidade dela para fazer a revisão do texto, as sugestões e os conselhos sempre úteis e pertinentes. E o grande apoio que foi além da orientação acadêmica, que foi a amizade e o carinho, sempre me apoiando e me acalmando.

Agradecimento especial também às Professoras Vanessa Osório e Daniela pela paciência e confiança na disponibilização de materiais para realização das análises, sugestões de conselhos essenciais para a concretização dos experimentos.

À professora Milene pela confiança, sugestões, por viabilizar os materiais e reagentes de seu laboratório de Citogenética mas também por ofertá-lo para fazer parte do meu trabalho. Além disso, a ajuda e a receptividade dos alunos dela, pertencentes ao laboratório, em especial a Thammyres, Thayllon e Maicon.

O meu agradecimento ao produtor Paulo R. C. Cordeiro de Nova Friburgo – RJ pelo fornecimento das amostras para realização das análises e também à Empresa Brasil Kirin de São José dos Campos-SP.

À técnica da Central Analítica, Mayara, pela prestatividade nas análises no HPLC, e agradeço também a ajuda dos outros técnicos da instituição pelos auxílios diretos e indiretos.

À Tarsila, aluna do mestrado em alimentos, pela realização dos testes microbiológicos e a sua Professora Responsável Patrícia Campos Bernardes por disponibilizar materiais e o uso do seu laboratório. À Professora Pollyana Ibrahim pela disponibilidade e gentileza em ceder um reagente para a execução deste trabalho.

Aos meus colegas que se tornaram amigos: Carol, Davi, Luiza e Roberta. Em especial, a minha grande amiga Carol com a qual compartilhei meus melhores e

piores momentos por que passei durante todo o mestrado. Obrigada pela sua amizade e paciência.

Aos meus primos e amigos de república: Cristiana, Marcela, Filipe e Viviane, que me ajudaram de forma direta e indireta na conclusão desse trabalho. Obrigada pelo carinho e amizade.

Ao meu namorado e amigo Marcos, que vem me suportando nos períodos mais estressantes e sempre me apoiando em tudo nessa minha caminhada acadêmica.

A minha família, mãe e irmãos, pois sem eles isso nunca poderia ter se realizado. Obrigada pelo apoio sempre, obrigada por tudo.

E a todos aqueles que são ou foram importantes no desenvolvimento deste projeto, que de algum modo contribuíram para a execução deste trabalho, o meu especial obrigada.

RESUMO

SILVA, CAMILA. CARACTERIZAÇÕES QUÍMICAS DOS PRIMEIROS CULTIVARES DE LÚPULO (*Humulus lupulus* L.) PRODUZIDOS NO BRASIL. 2019. Dissertação (Mestrado em agroquímica) - Centro De Ciências Exatas, Naturais e da Saúde – CCENS, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2019. Orientadora: Patrícia Fontes Pinheiro. Coorientadores: Vanessa Moreira Osório e Alexandre Fontes Pereira.

O lúpulo em flor (*Humulus lupulus* L.), utilizado na produção de cervejas, é responsável por conferir sabor, aroma e o amargor para a bebida, além disso, é considerado um bactericida e conservante natural. Os aromas e o amargor proporcionados pelo lúpulo na cerveja são atribuídos à presença de óleos essenciais e de α - e β -ácidos. O Brasil não é produtor de lúpulo, por isso, essa matéria-prima na produção de cervejas é importada, praticamente 100% pelas grandes empresas fabricantes do país. Recentemente, após diversas tentativas, alguns pequenos produtores brasileiros têm obtido êxito no cultivo do lúpulo. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo realizar a caracterização química de amostras de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) em flor cultivadas no Brasil, determinando a composição de seus óleos essenciais e dos α - e β -ácidos. Para isso, foi desenvolvida e otimizada uma metodologia para extração dos voláteis de lúpulo por HS-SPME (modo *headspace*, microextração em fase sólida) para posterior análise em GC-MS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas), variando os parâmetros: tempo (10, 20 e 30 minutos) e temperatura (30, 50 e 70 °C), usando a fibra DVB/CAR/PDMS. As três amostras usadas para esse fim foram: uma de lúpulo em flor fresco, outra de flor seca sob vácuo e outra processada em *pellets*. As variáveis mais significativas no processo de otimização de extração foi a 30 °C em apenas 10 minutos, usando 0,100g de lúpulo. Usando essas condições, foram analisadas por HS-SPME/GC-MS amostras de lúpulos cultivadas no Brasil de diferentes variedades internacionais (Canastra, Cascade, Columbus, Hallertauer Mittelfrüh, Saaz, Victoria, Bullion), duas amostras de lúpulos brasileiros de variedades ainda não certificadas ('Brazylistk' e 'Mantiqueira') e uma amostra de lúpulo importado (cascade em *pellets*). O β -mirceno foi o constituinte majoritário em todas as amostras de lúpulos em flor cultivadas no Brasil, diferente do resultado encontrado para a amostra de lúpulo cascade em *pellets* importada, cujos

majoritários foram o α -humuleno e trans-cariofileno. O β -farneseno foi encontrado em todas as amostras de lúpulos analisadas. Para identificação e quantificação dos α - e β -ácidos das amostras de todos os lúpulos supracitadas foi realizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), na qual a quantificação foi realizada pelo método do padrão externo utilizando para a calibração o ICE-3 (*International Calibration Extract 3*). Os teores desses ácidos foram diferentes entre as variedades de lúpulos, contudo, os valores foram abaixo dos relatados na literatura, o tempo de armazenamento do material pode ter influenciado, bem como o modo de extração. Extratos etanólicos de lúpulos foram usados em ensaios de fitotoxicidade utilizando sementes de alface (eudicotiledônea) e sorgo (monocotiledônea). Houve efeito fitotóxico apenas em alface. Os extratos de lúpulos nomeados de E1 (cascade em *pellets*), E9 (Columbus) e E11 (Bullion) em concentrações abaixo de $1,90 \text{ mg.mL}^{-1}$ apresentaram parâmetros de inibição similares ao herbicida (glifosato). Novos estudos devem ser realizados com esses extratos a fim de confirmar o potencial herbicida deles.

PALAVRAS CHAVE: *Headspace*, voláteis, lúpulo brasileiro, α - e β -ácidos (CLAE), fitotoxicidade.

ABSTRACT

SILVA, CAMILA. CHEMICAL CHARACTERIZATIONS OF THE FIRST HOP CULTIVARS (*Humulus lupulus* L.) PRODUCED IN BRAZIL. 2019. Dissertação (Mestrado em agroquímica) - Centro De Ciências Exatas, Naturais e da Saúde – CCENS, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2019. Orientadora: Patrícia Fontes Pinheiro. Coorientadores: Vanessa Moreira Osório e Alexandre Fontes Pereira.

The hops flower (*Humulus lupulus* L.), used in the production of beers, is responsible to give flavor, aroma and bitterness to the beverage and in addition, it is considered a bactericide and natural preservative. The aromas and bitterness provided by hops to beer are attributed to the presence of essential oils and α - and β -acids. Brazil is not a producer of hops, therefore, this raw material in the production of beers is imported, nearly 100%, by the big manufacturing companies in the country. Recently, after several attempts, some small Brazilian producers have been successful in growing hops. Thus, the present study aimed to characterize the chemical samples of hops (*Humulus lupulus* L.) flower cultivated in Brazil, determining the composition of their essential oils and α - and β -acids. To do this, a methodology was developed and enhanced to extract hop volatiles by HS-SPME (headspace mode, solid phase microextraction) for later analysis in GC-MS (gas chromatography coupled to mass spectrometry), varying the parameters: time (10, 20 and 30 minutes) and temperature (30, 50 and 70 °C) using DVB/CAR/PDMS fiber. The three samples used for this purpose were: one of hops fresh flower, another of flower dried under vacuum and another processed in pellets. The optimized method was the extraction at 30 °C in just 10 minutes using 0,100g of hops. Under these conditions, samples of hops of different international varieties were cultivated in Brazil (Canastra, Cascade, Columbus, Hallertauer Mittelfrüh, Saaz, Victoria, Bullion) and analyzed by HS-SPME/GC-MS, two samples of Brazilian hops of not yet certified varieties ('Brazylick' and 'Mantiqueira') and a sample of imported hops (cascade in pellets). β -myrcene was the major component in all samples of hops cultivated in Brazil, different from the result found for the sample of cascade hops in imported pellets where the main ones were α -humulene and trans-caryophyllene. β -farnesene was found in all samples of hops analyzed. A high performance liquid chromatography (HPLC) was used to identify and quantify the α - and β -acids of the above-mentioned hops

samples, in which the quantification was performed with the external standard method using the calibration method ICE-3 (International Calibration Extract 3), the contents of these acids were different among the varieties of hops, however the values were below those reported in literature, the storage time of the material may have influenced it, as well as the mode of extraction. Ethanolic hops extracts were used in phytotoxicity tests using lettuce (eudicot) and sorghum (monocotyledon) seeds, with a phytotoxic effect only on lettuce. Hop extracts named E1 (cascade in pellets), E9 (Columbus) and E11 (Bullion) at concentrations below 1,90 mg. mL⁻¹ showed inhibition parameters similar to the herbicide (glyphosate). Further studies should be performed with these extracts to confirm their herbicidal potential.

KEY WORDS: Headspace. Brazilian hops. α - and β -acids (HPLC). Phytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1- Produção de cervejas – Brasil, 2005-2013 (em milhões de litros)..... | 23 |
| Figura 2- Estruturas dos principais constituintes dos óleos essenciais de lúpulo..... | 30 |
| Figura 3- A) Cones de lúpulo e B) Glândulas de Lupulina dentro do cone de lúpulo..... | 32 |
| Figura 4: Estruturas dos estereoisômeros <i>R</i> e <i>S</i> -linalol, encontrados em óleos essenciais de lúpulo..... | 33 |
| Figura 5- Estruturas químicas de α -humuleno e derivados oxigenados de humuleno..... | 35 |
| Figura 6- Estruturas químicas de β -cariofileno, óxido de cariofileno e 14-hidroxi-cariofileno..... | 35 |
| Figura 7- Estruturas dos principais α -ácidos e β -ácidos encontrados em lúpulo..... | 36 |
| Figura 8- Estruturas dos produtos de isomerização do humulono: cis-isohumulona e trans-isohumulona..... | 37 |
| Figura 9- Cromatogramas de íons totais das amostras de lúpulos em flor da variedade cascade (L1), cascade em <i>pelletes</i> (L2) e em flor da variedade 'Mantiqueira' (L3)..... | 48 |
| Figura 10- Gráfico de Pareto da amostra L1..... | 50 |
| Figura 11- Gráfico de Pareto da amostra L2..... | 51 |
| Figura 12- Gráfico de Pareto da amostra L3..... | 51 |
| Figura 13 – Gráfico de heatmap da porcentagem da área de pico calculada em cromatografia gasosa representada pela intensidade da cor..... | 55 |
| Figura 14: Diagrama de dispersão em relação aos principais grupos formados das 12 amostras de diferentes variedades de lúpulo..... | 56 |
| Figura 15 –Diagrama de dispersão em relação aos principais componentes de 25 componentes voláteis..... | 58 |
| Figura 16: Curva padrão do ICE-3 cohumulona..... | 59 |
| Figura 17: Curva padrão do ICE-3 n+adhumulona..... | 60 |
| Figura 18 - Curva padrão do ICE-3 colupulona..... | 60 |
| Figura 19 - Curva padrão do ICE-3 n+adlupulona..... | 60 |

LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

| | |
|--------------|---|
| HS-SPME | Microextração em fase sólida usando headspace |
| GC-MS | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa |
| DVB/CAR/PDMS | Fibra de divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| CLAE | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| ICE - 3 | Extrato Internacional de Calibração 3 |
| CR | Crescimento Radicular |
| CA | Crescimento Aéreo |
| IVG | Índice de Velocidade de Germinação |
| %G | Porcentagem de Germinação |
| DBO | Demanda Bioquímica de Oxigênio |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Produção de cervejas no Brasil em milhões de hectolitros por ano..... | 22 |
| Tabela 2 - Composição química média dos cones de lúpulo..... | 29 |
| Tabela 3 - Planejamento das análises de lúpulo por HS-SPME-GC/MS, utilizando fibra DVB/CAR/PDMS..... | 41 |
| Tabela 4 - Planejamento Fatorial 2 ² dos compostos mirceno, cariofileno, humuleno e farneceno..... | 49 |
| Tabela 5 - Compostos Químicos dos voláteis de <i>Humulus lupulus</i> L..... | 54 |
| Tabela 6 - Principais componentes, seus respectivos autovalores e percentuais simples e acumulados da variância total em relação às variedades de lúpulo..... | 58 |
| Tabela 7 - Principais componentes, seus respectivos autovalores e percentuais simples e acumulados da variância total em relação aos compostos voláteis de lúpulo..... | 58 |
| Tabela 8 - Quantificação dos α e β ácidos (Cohumulona, n+adhumulona, colupulona e n+adlupulona) das 11 variedades de lúpulo dado em % (g/100g de lúpulo seco)..... | 62 |
| Tabela 9 - Percentual de ácidos totais (α e β ácidos) nas variedades de lúpulo..... | 62 |
| Tabela 10 - Quantificação dos α e β ácidos (Cohumulona, n+adhumulona, colupulona e n+adlupulona) de 3 variedades de lúpulo comercial dado em % (g/100g de lúpulo seco)..... | 63 |
| Tabela 11 - Porcentagem de α e β ácidos de três variedades de lúpulo comercial..... | 63 |
| Tabela 12 - Fitotoxicidade do extrato etanólico de cascade em <i>pellets</i> (E1), em diferentes concentrações (mg.mL ⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> | 65 |
| Tabela 13 - Fitotoxicidade do extrato etanólico E3 (Mantiqueira), em diferentes concentrações (mg.mL ⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> | 66 |
| Tabela 14 - Fitotoxicidade do extrato etanólico E5 (Canastra), em diferentes concentrações (mg.mL ⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> | 66 |
| Tabela 15 - Fitotoxicidade do extrato etanólico E6 (Saaz colhida em dezembro de 2017), em diferentes concentrações (mg.mL ⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> | 67 |

| | |
|---|----|
| Tabela 16 - Fitotoxicidade do extrato etanólico E7 (Saaz colhida em fevereiro de 2018), em diferentes concentrações (mg.mL ⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> | 68 |
| Tabela 17 - Fitotoxicidade do extrato etanólico E9 (Columbus), em diferentes concentrações (mg.mL ⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> | 68 |
| Tabela 18 - Fitotoxicidade do extrato etanólico E10 (Brazylisk), em diferentes concentrações (mg.mL ⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> | 69 |
| Tabela 19 - Fitotoxicidade do extrato etanólico E11 (Bullion), em diferentes concentrações (mg.mL ⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de <i>Lactuca sativa</i> | 70 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 15 |
| 2. OBJETIVOS..... | 17 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 17 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 17 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 19 |
| 3.1. CERVEJA: DEFINIÇÃO E UM BREVE HISTÓRICO..... | 19 |
| 3.1.1 Indústria Cervejeira..... | 21 |
| 3.1.2. Matéria-Prima e o Processamento da Cerveja..... | 23 |
| 3.2. LÚPULO..... | 26 |
| 3.2.1 Características botânicas e distribuição..... | 26 |
| 3.2.2 Composição geral do lúpulo..... | 29 |
| 3.2.3 Atividade biológica do óleo essencial e extratos do lúpulo..... | 38 |
| 4. METODOLOGIA..... | 41 |
| 4.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DOS VOLÁTEIS POR HS-SPME..... | 41 |
| 4.1.1 Obtenção das amostras de lúpulo (variedades)..... | 41 |
| 4.1.2 Estudo das variáveis significativas para determinação dos compostos voláteis de lúpulo por HS-SPME/GC-MS..... | 41 |
| 4.1.3 Determinação dos compostos voláteis nas amostras de lúpulos após o estudo do planejamento fatorial..... | 42 |
| 4.2 ANÁLISES DE A E B-ÁCIDOS EM AMOSTRAS DE LÚPULOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)..... | 43 |
| 4.3 TESTE DE FITOTOXICIDADE..... | 44 |
| 4.3.1 Material vegetal (variedades de lúpulo)..... | 44 |
| 4.3.2 Obtenção dos extratos..... | 44 |
| 4.3.3 Fitotoxicidade..... | 45 |
| 4.3.4 Análise Estatística..... | 46 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 47 |
| 5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DOS VOLÁTEIS POR HS-SPME..... | 47 |
| 5.1.1 Estudo de metodologia para determinação de voláteis de lúpulo por HS-SPME/GC-MS..... | 47 |
| 5.1.2 Obtenção dos Cromatogramas e Espectro de Massas dos Compostos Voláteis do Lúpulo..... | 47 |

| | |
|--|-----------|
| 5.1.3 Planejamento Fatorial 2² - Estudo das variáveis significativas para determinação dos compostos voláteis de lúpulo por HS-SPME/GC-MS..... | 49 |
| 5.1.4 Aplicação do planejamento fatorial para determinação dos compostos voláteis nas amostras de lúpulo..... | 52 |
| 5.2 QUANTIFICAÇÃO DOS A E B ÁCIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)..... | 59 |
| 5.2.1 Curva Padrão, ICE-3..... | 59 |
| 5.2.2 Quantificação α e β ácidos do lúpulo brasileiro e de lúpulo comercial..... | 61 |
| 5.3 FITOTOXICIDADE..... | 64 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 72 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 73 |
| ANEXOS..... | 79 |

1. INTRODUÇÃO

A origem das primeiras bebidas alcoólicas é desconhecida, mas acredita-se que tenha sido iniciada na Mesopotâmia. Há relatos que a cerveja era produzida por cevada maltada na Babilônia em 6000 a.C., sendo desde então uma das bebidas mais populares do mundo. Considerada uma matriz complexa, a cerveja, contém metabólitos voláteis que contribuem para o seu sabor, amargor e aroma e as principais matérias-primas usadas na sua produção são água, malte, lúpulo e levedo (GONÇALVES *et al.*, 2014; ROSA; AFONSO, 2015; FILHO; GASTONI, 2010; KRAMER *et al.*, 2015).

A indústria cervejeira é uma das mais relevantes da economia brasileira, empregando cerca de 2,2 milhões e responsável por 1,6% do PIB. O Brasil ocupou o 3º lugar no rank de consumo global de cerveja em 2012 e em 2013, além disso, favorecem redes de pesquisa, cultivo, comercialização dos insumos e matérias primas até a entrega ao consumidor, movimentando diversas áreas profissionais (CERV BRASIL, 2018).

O lúpulo na fabricação da cerveja é o componente de menor quantidade e de custo mais elevado, sendo essencial para fornecer aromas característicos, tais como: floral, picante, herbáceo, arborizado e frutado, além de ser considerado o principal responsável pelo amargor, estabilidade microbiológica e físico-química da cerveja (GONÇALVES *et al.*, 2014; ROSA; AFONSO, 2015; FILHO; GASTONI, 2010; KRAMER *et al.*, 2015).

O lúpulo utilizado nas grandes cervejarias é praticamente 100% importado, porém, nos últimos anos, iniciou-se a plantação de lúpulo no Brasil. Após várias tentativas, alguns pequenos produtores brasileiros têm obtido êxito no cultivo dessa planta para fabricação de cervejas artesanais. A produção do lúpulo brasileiro é ainda de pequena escala e está em fase de testes (SARNIGHAUSEN, SARNIGHAUSEN, DAL PAI, 2017).

A composição química do lúpulo depende de fatores genéticos (maturação, geografia), que distinguem as diversas variedades de lúpulo, fatores e processamento pós-colheita como amadurecimento, processamento e armazenamento. As características como aroma e amargor de uma cerveja estão também relacionadas à quantidade e qualidade da dosagem de lúpulo e tempo de

adição de lúpulo, bem como a tecnologia geral de fabricação de cerveja aplicada (RETTBERG; BIENDL; GARBE; 2018).

Óleos essenciais (voláteis) são os principais componentes aromáticos do lúpulo, como principais componentes fazem parte do grupo de monoterpenos e sesquiterpenos. A composição dos óleos essenciais é característica do genótipo do lúpulo e, juntamente com os ácidos amargos e flavonoides, tem sido usado para distinguir diferentes variedades de lúpulo, sendo pelo menos 200 diferentes variedades de lúpulo cultivadas em todo o mundo. Dessa forma, é de interesse no desenvolvimento de métodos para caracterização dessas variedades que podem ser usados para impedir a adulteração e classificação de diferentes origens geográficas ou países (FARAG, 2012).

Com os recentes desenvolvimentos nas técnicas de metabolômica vegetal, agora é possível detectar várias centenas de metabólitos simultaneamente e comparar as amostras de forma fiável para identificar diferenças e semelhanças das plantas. Diversas técnicas foram desenvolvidas para o perfil não-alvo de metabólitos em plantas, essas incluem HPLC-MS, SPME e GC-MS (FARAG, 2012).

Com o recente surgimento de plantações de lúpulo no Brasil e poucos estudos feitos para determinar a composição química dessas variedades, viu-se a necessidade de identificar os perfis aromáticos dessas plantas. Dessa forma, as amostras de lúpulos cultivados no Brasil a serem estudadas serão das variedades: Cascade, Saaz, Columbus, Canastra, Hallertauer Mittelfrüh, Bullion e Victoria, sendo essas originadas em outros países. Além dessas amostras, serão analisadas amostras de lúpulo ainda não certificadas, que podem ser novas variedades do Brasil, sendo uma delas o lúpulo denominado 'Brazylijsk', uma variedade que chegou ao país na época da colonização de poloneses no Estado do Paraná (1860 ou 1870), cultivada até hoje em pequenas propriedades no Sul desse Estado. O nome desse material foi dado pelo produtor Jones Boyaski, sendo o significado 'brasileiro' em polaco.

A outra variedade ficou conhecida como lúpulo 'Mantiqueira', material obtido por Rodrigo Veraldi que obteve sucesso após tentativas de cultivar essa planta na região que tem esse mesmo nome, sendo considerada uma variedade inédita, pois foi obtida a partir de sementes que germinaram no solo e condições climáticas do Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

- Desenvolver e otimizar uma metodologia de extração dos constituintes voláteis de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) em flor e em pellets, usando HS-SPME/GC-MS (modo *headspace*, microextração em fase sólida, e posterior análise com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas).
- Determinar a composição química dos voláteis (óleos essenciais) e dos α - e β -ácidos dos primeiros cultivares de espécies de *H. Lupulus*, produzidos no Brasil.
- Realizar ensaios biológicos utilizando extratos de lúpulos em flor cultivados no Brasil (11 variedades).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar um método para a extração dos constituintes voláteis de lúpulos por HS-SPME/GC-MS (modo *headspace*, microextração em fase sólida combinada com cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas), variando os parâmetros: tempo (10, 20 e 30 minutos) e temperatura (30, 50 e 70 °C), usando a fibra DVB/CAR/PDMS.
- Utilizar a metodologia desenvolvida para a extração de voláteis de lúpulos por HS-SPME/GC-MS para analisar as amostras de diferentes variedades (Canastra, Cascade, Columbus, Hallertauer Mittelfrüh, Saaz, Victoria, Bullion) e de lúpulos brasileiros de variedades ainda não certificadas 'Brazylisk' e 'Mantiqueira'.
- Analisar estatisticamente os dados e averiguar as condições ótimas para extrair os voláteis em amostras de lúpulo.
- Encontrar o perfil dos óleos essenciais por HS-SPME/GC-MS e determinar os teores dos α - e β -ácidos por HPLC das diferentes variedades de lúpulos cultivadas no Brasil.

- Determinar o potencial fitotóxico do extrato etanólico de 11 variedades de lúpulo em sementes de sorgo (*Sorgum bicolor* L. Moench) e alface (*Lactuca sativa* L.).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CERVEJA: DEFINIÇÃO E UM BREVE HISTÓRICO

A cerveja é uma bebida alcoólica produzida a partir da cevada (planta da família gramíneas com alta quantidade de amido), água, lúpulo e leveduras, com história de 6000 a 8000 anos (FILHO; GASTONI, 2010; SANTOS; DINHAM, 2006). Uma definição legal da cerveja foi publicada no Decreto n. 6.871, de 4 de junho de 2009, publicado no Diário Oficial da União de 04/06/2009, regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, registro, fiscalização e inspeção da produção de bebidas alcoólicas. O Art. 36 do referido decreto define:

Art. 36. Cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo.

§ 1º O malte de cevada usado na elaboração de cerveja e o lúpulo poderão ser substituídos por seus respectivos extratos.

§ 2º Malte é o produto obtido pela germinação e secagem da cevada, devendo o malte de outros cereais ter a designação acrescida do nome do cereal de sua origem.

§ 3º Extrato de malte é o resultante da desidratação do mosto de malte até o estado sólido, ou pastoso, devendo, quando reconstituído, apresentar as propriedades do mosto de malte.

§ 4º Parte do malte de cevada poderá ser substituído por adjuntos cervejeiros, cujo emprego não poderá ser superior a quarenta e cinco por cento em relação ao extrato primitivo.

§ 5º Consideram-se adjuntos cervejeiros a cevada cervejeira e os demais cereais aptos para o consumo humano, malteados ou não-malteados, bem como os amidos e açúcares de origem vegetal.

§ 6º Quando se tratarem de açúcares vegetais diferentes dos provenientes de cereais, a quantidade máxima de açúcar empregada em relação ao seu extrato primitivo será:

I - Na cerveja clara, menor ou igual a dez por cento em peso;

II - Na cerveja escura, menor ou igual a cinquenta por cento em peso, podendo conferir ao produto acabado as características de adoçante; e

III - na cerveja extra, menor ou igual a dez por cento do extrato primitivo.

§ 7º Carboidratos transformados são os derivados da parte amilácea dos cereais obtidos por meio de transformações enzimáticas.

§ 8º Mosto cervejeiro é a solução, em água potável, de carboidratos, proteínas, glicídios e sais minerais, resultantes da degradação enzimática dos componentes da matéria-prima que compõem o mosto.

§ 9º Mosto lupulado é o mosto fervido com lúpulo ou seu extrato, e dele apresentando os princípios aromáticos e amargos, ficando estabelecido que:

I - Lúpulo são os cones da inflorescência do *Humulus lupulus*, em sua forma natural ou industrializada, aptos para o consumo humano; e

II - Extrato de lúpulo é o resultante da extração, por solvente adequado, dos princípios aromáticos ou amargos do lúpulo, isomerizados ou não, reduzidos ou não, devendo o produto final estar isento de solvente.

§ 10. Extrato primitivo ou original é o extrato do mosto de malte de origem da cerveja (BRASIL, 2009).

A origem exata das primeiras bebidas alcoólicas é ainda desconhecida, mas acredita-se que tenha sido iniciada na Mesopotâmia feita com cevada, tâmaras, uvas ou mel. Há relatos também que, a cerveja, era produzida por cevada maltada na Babilônia em 6000 a.C. (GONÇALVES *et al.*, 2014; ROSA; AFONSO, 2015; FILHO; GASTONI, 2010).

A história da cerveja está fortemente ligada à agricultura, pois os seus ingredientes eram os mesmos utilizados no pão, e servia de complemento alimentar. A produção era função das mulheres, como ainda é até hoje em algumas aldeias africanas. A produção também tinha relação com a religião, onde eram feitas por mosteiros que consumiam durante os períodos de jejum religioso, diferente do vinho que era sagrado e não poderia ser consumido, pois quebraria o jejum (SANTOS; DINHAM, 2006).

Na Idade Média, mosteiros fabricavam cerveja com diversas ervas como: rosmaninho, louro, sálvia, gengibre e lúpulo. Contudo, a variação das proporções de água, malte, lúpulo e leveduras no processo de fabricação resulta em diversos tipos de cerveja, além de algumas possuírem matérias-primas como trigo ou milho (GONÇALVES *et al.*, 2014; ROSA; AFONSO, 2015; FILHO; GASTONI, 2016).

Foram os egípcios que tornaram a cerveja conhecida por outros povos orientais, europeus e o resto do mundo. Pouco tempo atrás foi encontrada uma receita de cerveja extraída de murais de túmulos egípcios datados de 2650 e 2180 a.C. Essa cerveja tinha coloração castanha escura, gosto amargo, grau alcoólico de 10%, baixo teor de gás carbônico e quase nenhuma espuma (FILHO; GASTONI, 2016).

No ano de 1516, foi aprovada o que é conhecida como a lei mais antiga do mundo sobre a manipulação de alimentos, a lei alemã *Reinheitsgebot*, que dizia que a cerveja deveria ser produzida somente por cevada, lúpulo e água. Muitas ervas foram utilizadas no decorrer dos anos na produção de cerveja, mas foi o lúpulo que se tornou a matéria-prima essencial para a produção. Apesar do lúpulo ter sido cultivado na Babilônia em épocas tão distantes quanto 200 d.C., não existem registros do seu uso na cerveja até o ano de 1079. Somente depois da lei alemã

Reinheitsgebot foi decretado que apenas o lúpulo forneceria o sabor amargo na fabricação da cerveja (FILHO; GASTONI, 2016).

O uso do lúpulo (*H. lupulus*) antigamente era na medicina tradicional, como erva popular, principalmente em chás de banhos, ou como ingrediente de alimentos e também como remédio natural usado pelos curadores contra a lepra, o chulé, constipação e purificação do sangue. Na medicina tradicional chinesa, o lúpulo era usado no tratamento da ansiedade e insônia, além de estimular o apetite (KARABIN *et al.*, 2015).

No Brasil, o costume de beber cerveja foi trazido por D. João VI, no início do século XIX, durante a permanência da família real portuguesa no país. A cerveja consumida era europeia e apenas em 1888 que foi fundada no Rio de Janeiro a “Manufatura de Cerveja Brahma Villigier e Cia” e pouco tempo depois em 1891 em São Paulo criada a “Companhia Antártica Paulista” (FILHO; GASTONI, 2016).

3.1.1 Indústria Cervejeira

A indústria cervejeira é um dos setores mais proeminentes da economia brasileira com investimento de 20 bilhões entre os anos de 2010 e 2014, empregando mais de 2,2 milhões de pessoas e responsável por 1,6% do PIB e 14% da indústria de transformação nacional. Além disso, movimenta as redes de pesquisa, cultivo, o processamento e a comercialização de insumos e matérias-primas até a entrega do produto ao consumidor, no ponto de venda. Com isso, movimenta cerca de 12 mil fornecedores de bens e serviços e aproximadamente 8 milhões de profissionais das mais diversas áreas (CERVBRASIL, 2018).

A Tabela 1 mostra que o consumo anual de cerveja no Brasil caiu 2,0% devido ao aumento de impostos. Na Rússia, ocorreu queda em 8,0 % do consumo também por problemas econômicos e aumento de impostos. Já nos Estados Unidos e no Reino Unido, apresentaram queda de 1,3 % no consumo, porém o consumo de cerveja artesanal apresentou aumento de 14% em 2013 em relação ao ano anterior (KIRIN, 2014).

A China permaneceu como maior consumidor do mundo por 11 anos consecutivos desde 2003 e o Japão permaneceu em sétimo lugar no consumo anual

por sete anos consecutivos. Na Índia, o consumo per capita é ainda pequeno, mas apresentou crescimento nos últimos anos devido ao aumento populacional e crescimento econômico como mostra na tabela (KIRIN, 2014).

Tabela 1 - Consumo Global de cerveja por País em 2013.

| Rank 2013 | Rank 2012 | País | 2013 | | | 2012 | |
|-----------|-----------|-----------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | Consumo Volume (mil kl) | quota de mercado global | Taxa de crescimento 2012-2013 | Consumo Volume (mil kl) | quota de mercado global |
| 1 | 1 | China | 4.631,3 | 24,5% | 4,8% | 4.420,0 | 23,5% |
| 2 | 2 | Estados Unidos | 2.408,2 | 12,8% | -1,3% | 2.440,9 | 13,0% |
| 3 | 3 | Brasil | 1.252,0 | 6,6% | -2,0% | 1.277,6 | 6,8% |
| 4 | 4 | Rússia | 1.005,6 | 5,3% | -8,0% | 1.093,0 | 5,8% |
| 5 | 5 | Alemanha | 841,0 | 4,5% | -2,2% | 859,8 | 4,6% |
| 6 | 6 | México | 673,0 | 3,6% | -1,9% | 685,7 | 3,7% |
| 7 | 7 | Japão | 548,9 | 2,9% | -1,0% | 554,4 | 3,0% |
| 8 | 8 | Reino Unido | 424,2 | 2,2% | -1,3% | 429,8 | 2,3% |
| 9 | 9 | Espanha | 364,8 | 1,9% | -0,6% | 367,0 | 2,0% |
| 10 | 11 | Vietnã | 360,1 | 1,9% | 7,3% | 335,8 | 1,8% |
| 11 | 10 | Polônia | 351,1 | 1,9% | -3,6% | 364,3 | 1,9% |
| 12 | 12 | África do Sul | 315,0 | 1,7% | 0,0% | 315,0 | 1,7% |
| 13 | 13 | Ucrânia | 276,0 | 1,5% | -8,2% | 300,5 | 1,6% |
| 14 | 15 | Índia | 243,6 | 1,3% | 14,1% | 213,4 | 1,1% |
| 15 | 18 | Coreia do Sul | 227,7 | 1,2% | 15,2% | 197,6 | 1,1% |
| 16 | 17 | Venezuela | 212,6 | 1,1% | 3,2% | 206,0 | 1,1% |
| 17 | 14 | Canadá | 212,0 | 1,1% | -2,6% | 217,6 | 1,2% |
| 18 | 16 | Colômbia | 210,7 | 1,1% | 0,9% | 208,9 | 1,1% |
| 19 | 20 | República Checa | 190,9 | 1,0% | 0,2% | 190,5 | 1,0% |
| 20 | 19 | França | 186,3 | 1,0% | -3,2% | 192,5 | 1,0% |
| 21 | 23 | Tailândia | 183,7 | 1,0% | 0,3% | 183,2 | 1,0% |
| 22 | 21 | Argentina | 182,8 | 1,0% | -1,4% | 185,3 | 1,0% |
| 23 | 24 | Austrália | 174,3 | 0,9% | -0,3% | 174,8 | 0,9% |
| 24 | 22 | Romênia | 173,5 | 0,9% | -6,1% | 184,8 | 1,0% |
| 25 | 25 | Itália | 166,4 | 0,9% | -1,0% | 168,1 | 0,9% |

Fonte: KIRIN, 2014.

Em 2014, o Brasil produziu 14 bilhões de litros de cerveja, mantendo o terceiro lugar no *ranking* mundial de produção, atrás apenas da China e Estados

Unidos e a produção nacional cresceu a uma taxa média de 5% ao ano nos últimos dez anos (CERVBRASIL, 2018).

Na Figura 1, podemos ver que de 2004 a 2012 ocorreu um crescente aumento da produção de cerveja no Brasil. Contudo, em 2013, ocorreu uma queda na produção decorrente ao aumento de impostos no país.

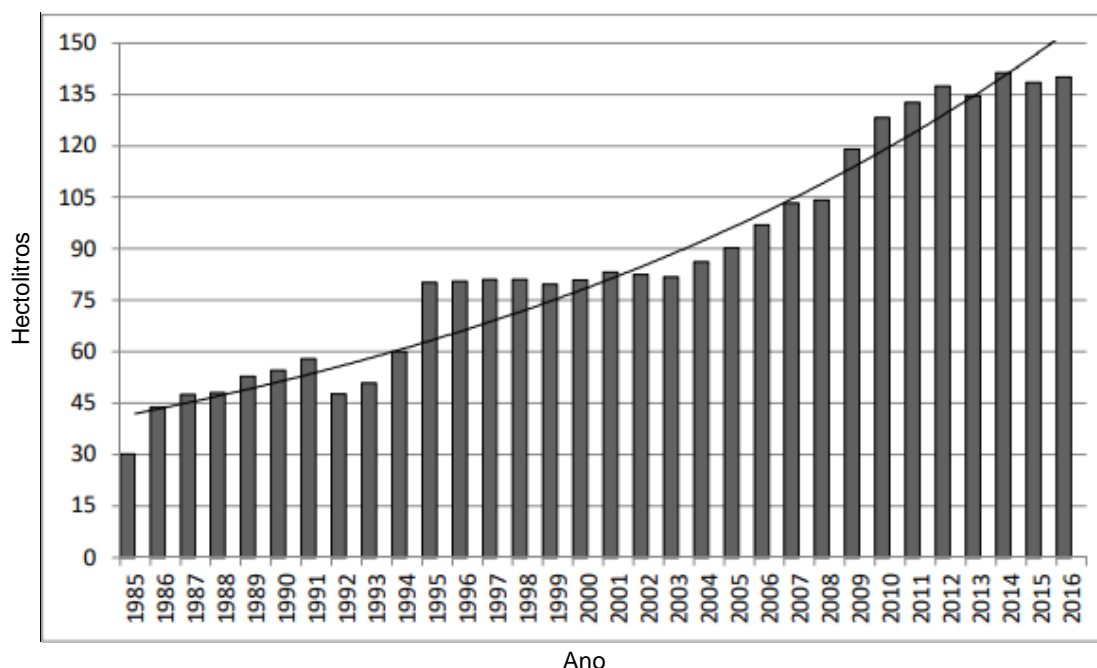


Figura 1 - Produção de cervejas no Brasil em milhões de hectolitros por ano.
Fonte: MARCUSSO; MULLER, 2018.

3.1.2 Matéria-prima e o processamento da cerveja

A cerveja é constituída por água, malte, lúpulo e adjuntos (leveduras). A água corresponde a 92 a 95% do peso da cerveja, dessa forma as indústrias cervejeiras devem localizar-se em regiões com águas de boa qualidade, pois toda água possui quantidade de sais dissolvidos que podem influenciar no gosto, odor e nos processos químicos e enzimáticos que ocorrem durante a fermentação e conseqüentemente na qualidade da cerveja (FILHO; GASTONI, 2016; SANTOS; DINHAM, 2006).

Uma água de qualidade deve: seguir padrões de potabilidade; apresentar alcalinidade de 50 mg.L⁻¹ ou menor e possuir concentração de cálcio em torno de 50

mg.L⁻¹. Além disso, deve-se analisar a dureza em carbonatos, odor, sabor, coloração, turbidez e exames microbiológicos (FILHO; GASTONI, 2016; SANTOS; DINHAM, 2006).

O malte é um termo que define a matéria-prima resultante da germinação de cereais como cevada, arroz, milho, trigo, aveia. O processo de transformação da cevada em malte nas cervejarias consiste em deixar a cevada de molho com água pura durante alguns dias para amolecer, em seguida, é drenada e colocada em condições favoráveis para ocorrer a germinação, controlando a temperatura, umidade e aeração, interrompendo a germinação antes que o grão inicie a formação de uma nova planta. Nessa fase, o amido presente no grão maltado apresenta cadeias menores que na cevada, produzindo enzimas fundamentais no processo de produção da cerveja (FILHO; GASTONI, 2016; SANTOS; DINHAM, 2006).

O lúpulo é de difícil cultivo e típico de regiões frias, sendo a flor fêmea utilizada na fabricação da cerveja, conferindo sabor amargo e aroma característicos a bebida. O lúpulo pode ser comercializado na forma de flores secas (*in natura*), *pellets* ou em extratos, que varia no teor de amargor e seu uso vai depender do objetivo do cervejeiro. A composição química do lúpulo consiste em proteínas, celulose, polifenóis, umidade, sais minerais, açúcares, lipídios, aminoácido, óleos essenciais e alfa e beta ácidos. Contudo, são os óleos essenciais e alfa e beta ácidos que fornecem o aroma e amargor a cerveja (FILHO; GASTONI, 2016; SANTOS; DINHAM, 2006).

Existe também o processo de lupulagem que são extratos isomerizados que permitem a melhor adequação do amargor após a fermentação, e os extratos isomerizados e reduzidos que fornecem proteção contraluz e retenção da espuma. O ajuste desses dois tipos de extratos também pode ser utilizado de acordo com as características que se desejam adquirir em uma cerveja (FILHO; GASTONI, 2016; SANTOS; DINHAM, 2006).

Os adjuntos podem ser denominados carboidratos não maltados que complementam ou suplementam o malte da cevada, que podem ser consideradas fontes não maltadas de açúcares que sofrem fermentação alcoólica, que pode vir do milho, arroz, trigo, aveia, entre outros (FILHO; GASTONI, 2016; SANTOS; DINHAM, 2006).

O processo de fabricação da cerveja consiste: em moagem do malte; mosturação; filtração do mosto; fervura do mosto; tratamento do mosto; fermentação; maturação e clarificação. A moagem do malte consiste na diminuição do grão de modo uniforme para a mosturação. O processo de mosturação pode variar de acordo com o tipo de cevada e do tipo de cerveja que se deseja produzir, e posteriormente é realizada a filtração do mosto, aproveitando somente o filtrado (FILHO; GASTONI, 2016; SANTOS; DINHAM, 2006).

Na próxima etapa, realiza-se a fervura do filtrado adicionando o lúpulo de concentração que pode variar de 0,4 a 1,4 g/L em relação ao volume inicial de fervura. O mosto é mantido em fervura por 60-90 minutos, até atingir a concentração desejada de açúcar para o início da fermentação. Com a fervura, o lúpulo fornece os compostos amargos e aromáticos responsáveis pelo sabor e aroma, além de favorecer evaporação do excesso de água e de compostos aromáticos indesejáveis ao produto final reduzindo até 10% do volume inicial (FILHO; GASTONI, 2016; SANTOS; DINHAM, 2006).

Após a fervura, faz-se o tratamento do mosto com a retirada do precipitado, resfriamento e aeração para iniciar o processo fermentativo. Esse processo é o ponto central para produção de todas as bebidas alcoólicas, onde são utilizadas culturas de leveduras após certo nível fermentativo, em condições anaeróbicas, com a finalidade de converter o açúcar em etanol e gás carbônico. Em seguida, ocorre a fermentação secundária, que é a maturação e podem durar algumas semanas ou até meses dependendo do tipo de cerveja (FILHO; GASTONI, 2016; SANTOS; DINHAM, 2006).

A maturação objetiva o desenvolvimento de reações que proporcionam características organolépticas no produto final; clarificação pela precipitação de leveduras, proteínas e sólidos insolúveis; alterações químicas que também auxiliam da clarificação melhorando o sabor e aroma; formação de gás carbônico de ajuda na carbonatação da cerveja; entre outros que variam de acordo com o objetivo do produto final (FILHO; GASTONI, 2016; SANTOS; DINHAM, 2006).

Por fim, realiza-se a clarificação que consiste em técnicas que podem ser usadas juntas ou separadas: sedimentação por gravidade; uso de agentes clarificantes; centrifugação e filtração. Essas etapas retiram as leveduras, partículas coloidais dos complexos proteínas-polifenóis e outras substâncias insolúveis

formadas devido ao baixo pH existente e a baixa temperatura, obtendo um produto brilhante e límpido para ser engarrafado (FILHO; GASTONI, 2016; SANTOS; DINHAM, 2006).

3.2 LÚPULO

3.2.1 Características botânicas e distribuição

O gênero *Humulus* pertence à família Cannabaceae, que em 2003 foi incluída na Ordem de Rosales. O único outro gênero da família é *Cannabis*, representado exclusivamente pela espécie *Cannabis sativa*, conhecida popularmente como cânhamo, maconha ou haxixe. Durante anos, acreditou-se que o gênero *Humulus* era representado apenas por duas espécies, *Humulus lupulus* e o *H. japonicus* (ALMAGUER *et al.*, 2014).

Em 1936, a espécie *Humulus yunnanensis* Hu foi descrita pela primeira vez, porém, permaneceu relativamente desconhecida, por ocorrer nas áreas de elevadas altitudes na província de Yunnan no Sul da China. Somente em 1978 esta espécie passou a ser mais amplamente conhecida (SMALL, 1978). Atualmente, a espécie mais conhecida do gênero é *H. japonicus*, uma planta nativa da China, Japão e ilhas vizinhas. Esta espécie não apresenta glândulas de lupulina, sendo mais utilizada para fins ornamentais (ALMAGUER *et al.*, 2014; FARAGÓ; PŠENÁKOVÁ; FARAGOVÁ, 2009).

O lúpulo, *H. lupulus*, é uma cultura economicamente importante cultivada na maioria das regiões temperadas do mundo. Esta espécie é dióica, ou seja, é representada por plantas masculinas e femininas. As inflorescências femininas são comumente designadas como 'cones de lúpulo' ou 'lúpulo'. Apenas os cones dos indivíduos femininos são capazes de secretar, através das glândulas de lupulina, o pó resinoso amarelado, onde se encontram os óleos essenciais e os α - e β -ácidos, produzidos pelos tricomas glandulares dos estróbilos (glândulas de lupulina). São estes compostos os principais responsáveis pelas características dadas à cerveja, por fornecer sabor e aroma, além de ser considerado um conservante natural e

estabilizante da espuma na cerveja (ALMAGUER *et al.*, 2014; OCVIRK; GRDADOLNIK; KOŠIR, 2016).

O nome *lupulus* é derivado do latim *lupus*, que significa um lobo subindo em uma ovelha, uma referência ao hábito trepador e volúvel da espécie, que “escala” outras plantas. Já a origem do nome *Humulus* ainda é duvidosa, porém é sugerido que tenha origem do nome húmus, uma referência aos solos férteis que a espécie ocorre e é cultivada (ZANOLI; ZAVATTI, 2008).

Nas áreas de cultivo, os indivíduos de lúpulo masculinos são removidos fisicamente, para evitar a fecundação das plantas femininas, evitando a produção de sementes. Na maior parte do mundo, as sementes são consideradas indesejáveis pelos cervejeiros. Acredita-se que a oxidação dos ácidos graxos das sementes produz sabores desagradáveis na bebida. Além disso, a ausência de sementes faz com que os lúpulos sejam geralmente mais ricos em óleos essenciais e resinas (α e β ácidos) do que aqueles fecundados. No entanto, plantas masculinas são essenciais na reprodução de lúpulo, para o desenvolvimento de novas variedades através novos cruzamentos (ALMAGUER *et al.*, 2014).

Cerca de 97% do lúpulo mundial cultivado é destinado para fins de cerveja, onde a produção mundial é dominada pela Alemanha e EUA. O cultivo da planta requer condições ideais, especialmente com relação à duração da luz do dia, temperatura durante o verão, precipitação anual e fertilidade do solo. A planta é cultivada em regiões temperadas de clima mais moderados. Mais de 60% da área de lúpulo sob cultivo está localizado na Alemanha e os EUA (ALMAGUER *et al.*, 2014, SIRRINE *et al.*, 2010). As maiores áreas de cultivo incluem Região de Hallertau na Alemanha e nos estados de Washington, Oregon e Idaho nos EUA. Outros países em crescimento no cultivo de lúpulo são a República Checa, Polônia, Eslovênia, Inglaterra, Ucrânia, China, África do Sul, Austrália e Nova Zelândia (ALMAGUER *et al.*, 2014).

Na Europa, ao longo dos séculos, as variedades de lúpulo tiveram o desenvolvimento a partir de seleção natural pelos plantadores e cervejeiros, nas diversas regiões de cultivo. Até a década de 1950, cada região de cultivo possuía sua própria variedade de lúpulo, que na maioria dos casos trazia o nome da região. Havia na Alemanha: em Hallertau- o lúpulo Hallertauer Mittelfruh, em Hersbruck- o lúpulo Hersbrucker Spat, em Spalt- o lúpulo Spalter e em Tett nang- o lúpulo

Tettbnanger. Na Elsácia, na França - o lúpulo Strissels palter, em Lublin na Polônia - o lúpulo Luvliner, em Saaz/Auscha na República Tcheca - o lúpulo Saazer (HVG, 2018).

A partir dos anos 50, os lúpulos foram trazidos aos mercados e novas variedades foram obtidas, por meio de cruzamentos seletivos. A aparência do lúpulo e o aroma eram as características mais importantes para a diferenciação das variedades, que são obtidas através dos cruzamentos. Além disso, as variedades podem ter influência nos aspectos microbiológicos, podendo aumentar a durabilidade microbiológica da cerveja, não havendo a necessidade em adicionar conservantes na bebida (VAUGHAN; O'SULLIVAN; VAN SINDEREN, 2005). Devido à ampla variedade de lúpulo em diferentes locais de plantio, podem existir diferentes compostos de uma variedade para outra, que alteram o sabor e amargor da cerveja, características essas que são influenciadas por fatores agrônômicos, localização e clima, pois podem alterar a produção e composição dos metabólitos do lúpulo (GONÇALVES *et al.*, 2014; ROSA; AFONSO, 2015; FILHO; GASTONI, 2010).

Nos últimos anos, iniciou-se a plantação de lúpulo no Brasil por um grupo de pessoas que têm interesse em fabricação própria de cervejas artesanais. Após várias tentativas, alguns pequenos produtores brasileiros têm obtido êxito no cultivo dessa planta. A área de plantio de lúpulo brasileiro para a safra 2018 no país foi em torno de 18 hectares, de acordo com dados obtidos no "1º Encontro de Plantadores de Lúpulo", na maioria dos locais as plantações encontram-se em nível de teste. Em algumas áreas existe a possibilidade de produção de 3200 plantas por hectare, tendo potencial na produção de 2,5 kg de cones frescos com plantas maduras (SARNIGHAUSEN; SARNIGHAUSEN; DAL PAI, 2017).

Apesar da produção do lúpulo brasileiro ser ínfima e estar em fase de testes, existe um grande potencial na expansão dessa cultura no Brasil, podendo ser de interesse para agricultura familiar e uma oportunidade para que um novo produto seja inserido no agronegócio do país. O Brasil pode vir a ter demanda de lúpulo para suprir as cervejarias nacionais, pois apresenta diversidade climática e elevado potencial para o setor agrícola, dessa forma, tem todos os requisitos para, no futuro, ser um grande produtor dessa planta (SARNIGHAUSEN; SARNIGHAUSEN; DAL PAI, 2017).

3.2.2 Composição geral do lúpulo

Cones de lúpulo inteiro compreendem vários componentes, como resinas, óleos essenciais, proteínas, polifenóis, lipídios, ceras, celulose e aminoácidos, como mostra a Tabela 2. Os voláteis de lúpulo (óleo essencial) são muito mistura heterogênea e complexa de centenas de compostos (BAMFORTH, 2016)

Tabela 2 - Composição química média dos cones de lúpulo.

| Composição química média de cones de lúpulo secos | |
|--|---------------|
| Constituinte | total (% m/m) |
| Resinas totais | 15-30 |
| Óleos essenciais | 0,5-3 |
| Proteínas | 15 |
| Monossacarídeos | 2 |
| Polifenóis (taninos) | 4 |
| Pectinas | 2 |
| Aminoácidos | 0,1 |
| Ceras e esteroides | Traços-25 |
| Cinzas | 8 |
| umidade | 10 |
| Celulose | 43 |

Fonte: BAMFORTH, 2016.

Os voláteis representam 0,5–3,0% (em massa) da matéria seca do cone de lúpulo como mostra a Tabela 2 e são nomeados com terpenos hidrocarbonetos e terpenóides. A grande maioria dos voláteis são subprodutos de metabolismo das plantas ou evoluem a partir do metabolito secundário (oxidativo) reações de moléculas precursoras voláteis e não voláteis. A combinação de biossíntese de terpeno e reações secundárias configura que a composição do óleo de lúpulo depende de fatores genéticos, maturação e geografia, mas também está sujeito a mudanças consideráveis durante o amadurecimento, processamento e armazenamento (RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018).

Na fabricação de cerveja, reações como oxidação e hidrólise continuam no processo de fermentação. Como resultado, apenas alguns odorantes sobrevivem ao

processo de fermentação em sua origem. Com isso, a ocorrência de características amargas ou aromáticas na cerveja depende de vários fatores relacionados ao lúpulo, nomeadamente a sua composição química, a quantidade adicionada, o tipo de produto de lúpulo e o tempo de dosagem do lúpulo (RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018).

Os principais constituintes do óleo essencial de lúpulo fresco são os monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), sendo os principais o mirceno, humuleno, cariofileno e farneseno (Figura 2). Estes compostos representam até 80% do total de voláteis de lúpulo cultivares criados para fabricação de cerveja (RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018; FARAG *et al.*, 2012).

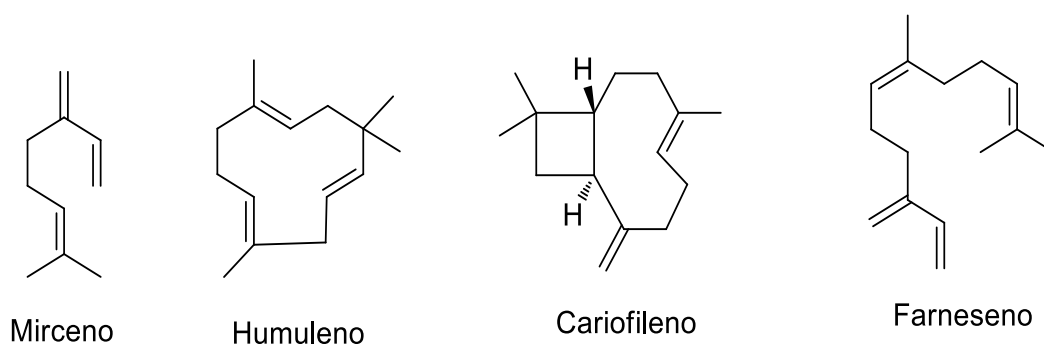


Figura 2 - Estruturas dos principais constituintes dos óleos essenciais de lúpulo. Fonte: Almaguer *et al.*, 2014.

O principal monoterpene volátil encontrado no lúpulo é o mirceno, que é encontrado na maioria das variedades e sua concentração altera entre 3 e 10 mg.g⁻¹ de matéria seca de lúpulo e seu odor é descrito como resina, pinho e erva. É um contribuinte significativo para o lúpulo de aroma, porém, sua concentração diminui fortemente durante o armazenamento de lúpulo aeróbio e durante a fabricação da cerveja. A auto-oxidação do mirceno dá origem a vários produtos de reação cíclica (por exemplo, α -pineno, β -pineno, canfeno, *p*-cimeno) e também forma terpenóides como linalol, nerol, geraniol, citral, α -terpineol ou carvona (RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018).

Derivados de mirceno oxigenados podem ser encontrados na cerveja, mas o próprio mirceno é efetivamente evaporado durante a ebulição do mosto, perdido pela lavagem durante a fermentação, ou adsorção das leveduras. As concentrações de

mircenos na cerveja na faixa de seu limiar de sabor de 30 a 100 mg.L⁻¹ (RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018).

Os principais sesquiterpenos encontrados no lúpulo são α -humuleno, β -cariofileno e β -farneseno, que possuem pontos de ebulição mais altos do que os monoterpenos. O α -humuleno é o mais abundante sesquiterpeno encontrado no lúpulo e foi um dos primeiros compostos a ser identificado no óleo de lúpulo, sendo o β -cariofileno o segundo (ALMAGUER *et al.*, 2014).

Quando um cromatograma de óleo de lúpulo típico é examinado, pode-se observar que grande parte do material é contada em três bandas de eluição. A substância responsável para o primeiro pico é β -mircenos; O β -cariofileno elui muito mais tarde e logo após, o pico para o α -humuleno aparece. O β -farneseno, um sesquiterpeno acíclico só é encontrado em certas variedades de lúpulo e geralmente em pequenas quantidades (ALMAGUER *et al.*, 2014, PISTELLI *et al.*, 2018).

Além destes, o lúpulo contém numerosas substâncias bicíclicas e tricíclicas de hidrocarbonetos terpênicos (isto é, bergamoteno, aromadendreno, β -selineno, germaceno e amorfeno). Os terpenóides são estruturas de carbono terpeno que contêm grupos funcionais (ALMAGUER *et al.*, 2014; RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018).

Além das funções cervejeiras que os constituintes do lúpulo possuem, os hidrocarbonetos terpênicos e terpenóides desempenham múltiplos papéis na fisiologia das plantas, onde são sintetizados e emitidos para defender a planta de lúpulo contra herbívoros e patógenos, mas também para atrair polinizadores e disseminadores de sementes. A biossíntese de terpenos ocorre primariamente nas glândulas de lupulina (tricomos glandulares) do cone de lúpulo (Figura 3B) (RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018).

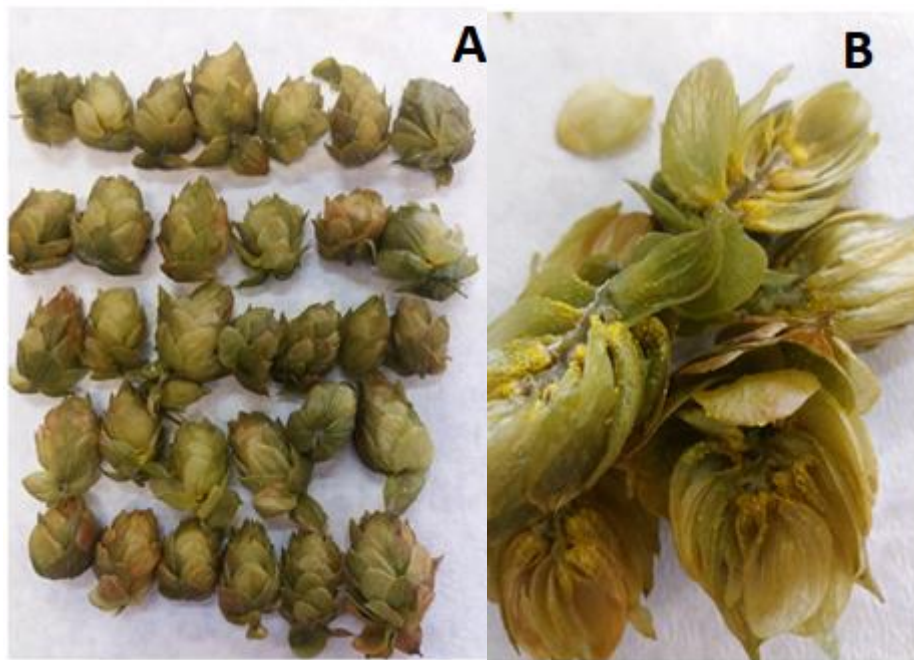


Figura 3 - A) Cones de lúpulo e B) Glândulas de Lupulina dentro do cone de lúpulo.
Fonte: o autor.

A fração de compostos oxigenados presente no óleo essencial de lúpulo correspondem a 30% do total de óleo essencial. Porém, nessa fração oxigenada, a maioria destes está presente abaixo do seu odor limiar de concentração. Normalmente, os compostos oxigenados do óleo de lúpulo compreendem duas porções principais que são denominadas porções "voláteis" e "não voláteis". O primeiro consiste em uma mistura complexa de compostos com pontos de ebulição inferiores ao do α -humuleno. A outra parte consiste em substâncias de maior ponto de ebulição, que são de interesse para o cervejeiro, uma vez que estes provavelmente serão retidos no mosto após ferver e eles podem, eventualmente, encontrar o caminho para final cerveja. A fração total oxigenada é uma mistura complexa de álcoois, aldeídos, ácidos, cetonas, epóxidos e ésteres (ALMAGUER *et al.*, 2014).

Diante disso, os principais álcoois presentes no óleo essencial de lúpulo são 2-metilbutanol e linalol, e em menor quantidade têm-se também o geraniol, nerolidol, nerol e terpineol. O mais abundante é o linalol, que é considerada uma importante substância indicadora na cerveja. A contribuição do linalol para o perfil de aroma no lúpulo depende do tratamento do lúpulo e não é perceptível na cerveja quando o lúpulo é adicionado no início da fervura. A contribuição de linalol para lúpulo de

aroma na cerveja é mais perceptível quando um atraso na adição de lúpulo é feito (menos tempo de fervura) (STEVENS, 1967; RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018).

O linalol é um produto de hidratação de β -mirceno e é também um composto quiral; portanto, existem dois estereoisômeros: (R) - (-) - linalol e (S) - (+) - linalol (Figura 4). Ambas as formas enantioméricas são encontradas no óleo essencial de lúpulo. Tem sido demonstrado que o (R) - linalol é mais aromatizante e, do conteúdo total de linalol, a forma (R) está geralmente presente em lúpulo entre 92 e 94% (ALMAGUER *et al.*, 2014).

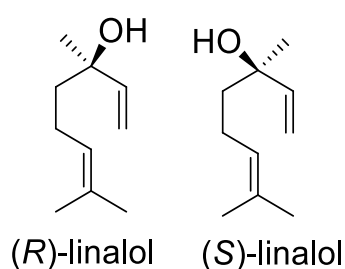


Figura 4 - Estruturas dos estereoisômeros R e S-linalol, encontrados em óleos essenciais de lúpulo.

Fonte: ALMAGUER *et al.*, 2014.

O odor floral dado à cerveja geralmente é oferecido pelo linalol. A concentração do limiar de odor do linalol na cerveja foi de 10 ppb (10 $\mu\text{g/L}$). Contudo, os valores limiares sensoriais são altamente dependentes nas propriedades olfativas e das estruturas das moléculas, mas também na matriz em que são testados. Porém, os dados encontrados na literatura disponíveis para o sabor limiares de linalol na cerveja variam significativamente, de 80 ppb descrito como tendo um sabor de anis (mais amargo); 27 ppb caracterizando-se como floral e cítrico, e mais recentemente, um valor de 8 ppb. Independente do limite, o linalol é um dos componentes de óleo de lúpulo que é universalmente aceito como sendo sabor ativo na cerveja (ALMAGUER *et al.*, 2014).

Entretanto, os hidrocarbonetos terpênicos, como β -mirceno, α -humuleno, β -cariofileno e β -farneceno que são hidrofóbicos, com corpos de isopreno e a ausência de grupos funcionais polares, causa solubilidade limitada em soluções aquosas no mosto e a cerveja. Mesmo que esses sejam os principais voláteis de lúpulo, eles raramente são encontrados na chaleira e tarde saltado (longa fervura). Durante a produção de cerveja, perdas consideráveis por evaporação que são lavados pelo

dióxido de carbono no fermentação e adsorção na biomassa. Dessa forma, os hidrocarbonetos terpênicos não contribuem ou contribuem pouco para sabor de cerveja, exceto em cervejas de lúpulo seco (Dry Hopping) (RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018).

Com a oxidação, durante o armazenamento de lúpulo e na ebulição no mosto, vários derivados ativos e oxigenados de sabor podem ser produzidos. A oxidação do humuleno resulta teoricamente na formação de três monoepóxidos de humuleno (numerados I a III), 12 diepóxidos e 18 triepóxidos. Apenas mono e diepoxides foram encontrados na cerveja e no lúpulo (RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018).

Durante a fermentação e armazenamento de cerveja, a hidrólise catalisada por prótons os epóxidos de humuleno produzem humulenol II e humulol como os principais produtos. A estrutura do α -humuleno e derivados de humuleno oxigenados selecionados são mostrados na Figura 5. Individualmente, os odores dos epóxidos de humuleno, humulol e o humulenol II é descrito como feno, mofo, cedro e artemísia; humuladienone como florido e fresco. O α -humuleno e β -cariofileno são descritos por ter um odor picante e lenhoso.

A oxidação do β -cariofileno predominantemente produz óxido de cariofileno (mofo, floral, picante, cedro) e 14-hidroxi- β -cariofileno (odor de madeira de cedro). O β -cariofileno e seus principais produtos de reação à oxidação são mostrados na Figura 6. A contribuição da oxigenação dos sesquiterpenos ao sabor da cerveja ainda não é totalmente compreendida. Seus valores de limiar de sabor são geralmente muito mais altos do que seus níveis em cerveja (RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018).

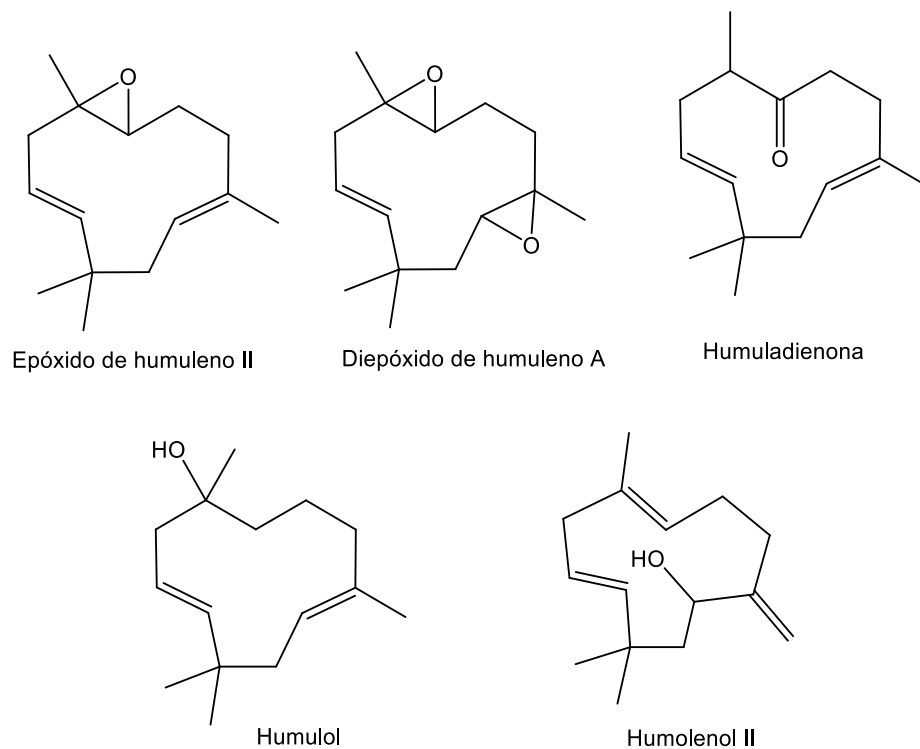


Figura 5 - Estruturas químicas dos derivados oxigenados do humuleno.
 Fonte: RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018.

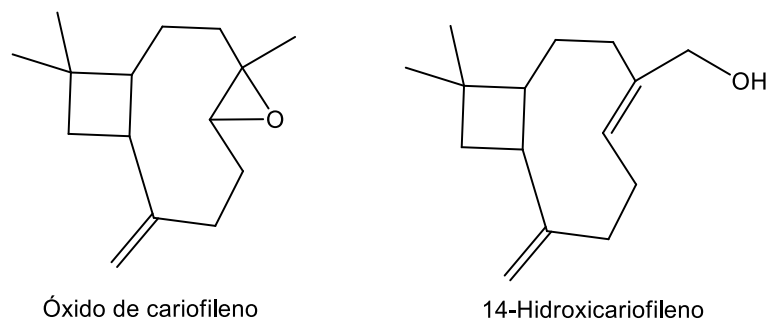


Figura 6 - Estruturas químicas do óxido de cariofileno e 14-hidroxi-cariofileno.
 Fonte: RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018.

No interior dos cones da planta de lúpulo feminino, também são encontradas substâncias denominadas α - e β -ácidos, que são ácidos fenólicos alicíclicos resinosos, também chamados de ácidos amargos do lúpulo. As principais estruturas desses α -ácidos (humulona, cohumulona e adhumulona) e β -ácidos correspondentes (lupulona, colupulona e adlupulona) foram apresentadas na Figura

7. Além das duas séries de normais, co- e ad-homologs, há alguns ácidos de lúpulo menores na planta, incluindo postumulona/postlupulona, prehumulona/prelupulona e adprehumulona (FARAG *et al.*, 2012).

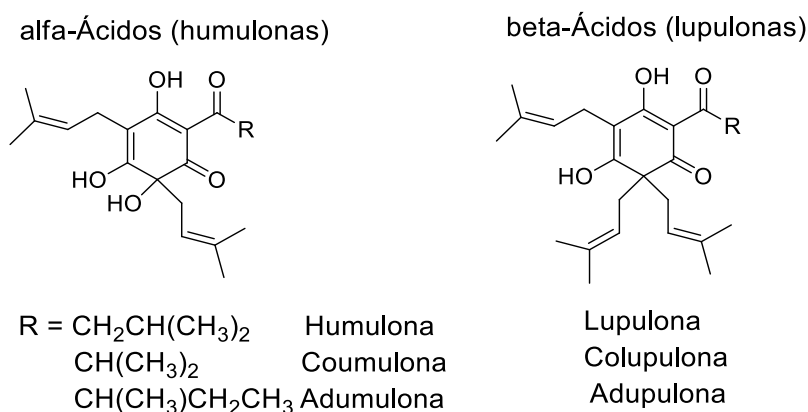


Figura 7 - Estruturas dos principais α -ácidos e β -ácidos encontrados em lúpulo. Fonte: KEUKELEIRE, 2000.

Os β -ácidos não contêm um grupo alcoólico terciário no núcleo aromático e, portanto, eles não são capazes de isomerização. A presença de outra cadeia lateral isoprenil faz com que a molécula como um todo exiba um caráter hidrofóbico. Portanto, são muito menos solúveis em água em comparação com os α -ácidos. Má solubilidade dos β -ácidos na água faz com que eles sejam normalmente perdidos durante o processo de fermentação durante a fervura do mosto (OLSOVSKA *et al.*, 2016). Diferentemente dos α -ácidos, os β -ácidos contribuem mais para o aroma da cerveja, mas também são muito oxidáveis e responsáveis, quando expostos à luz, por produzir sabores desagradáveis na cerveja (FARAG, *et al.*, 2012; ALMAGUER *et al.*, 2014).

Os α -ácidos são precursores de compostos que conferem amargor e que equilibram a doçura da cevada maltada e os β -ácidos contribuem significativamente menos para amarguras gerais (BAKER *et al.*, 2008). Além disso, os α -ácidos são insolúveis em água, que quando fervidos sofrem isomerização tornando-os solúveis, e quanto maior o tempo de fervura maior o amargor na cerveja. Durante a isomerização, o composto humulona origina duas isohumulonas epiméricas, que se distinguem como cis-isohumulonas e trans-isohumulonas, e o componente cis é

significativamente mais amargo (Figura 8). Foi também estabelecido que as isohumulonas são mais amargas que as isocohumulonas (ALMAGUER *et al.*, 2014).

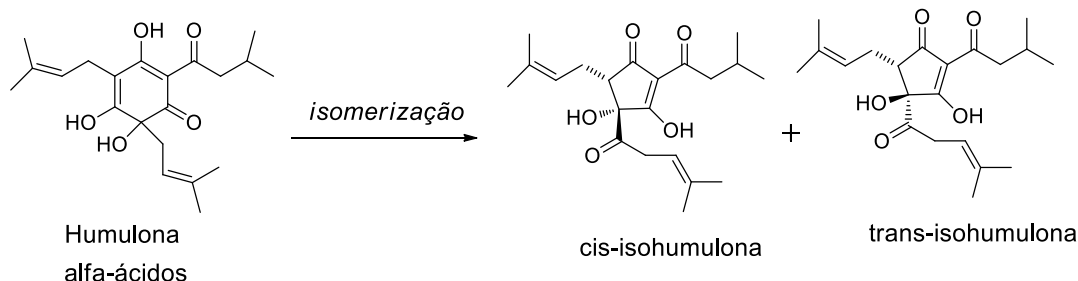


Figura 8 - Estruturas dos produtos de isomerização do humulono: cis-isohumulona e trans-isohumulona.

Fonte: Keukeleire, 2000.

Os seis principais iso- α -ácidos são: cis-isohumulona e trans-isohumulona, cis-isocoumulona e trans-isocoumulona, cis-isoadumulona e trans-isoadumulona, esses compostos estão presentes na cerveja resultante da conversão dos três principais α -ácidos (KEUKELEIRE, 2000; BAKER *et al.*, 2008). O composto mais amargo é cis-isohumulona e o menos amargo é trans-isocohumulona. Dessa forma, mais de 85% do sabor amargo percebido na cerveja é entregue pelos iso- α -ácidos, e o restante é dado através de outras substâncias, tais como polifenóis de lúpulo e produtos de oxidação dos β -ácidos, isto é, hupuponas que também contribuem para o amargor da cerveja (ALMAGUER *et al.*, 2014).

Nesse caso, para produzir uma cerveja amarga, é preciso adicionar o lúpulo ao mosto quente no início da fervura da chaleira para a conversão térmica dos α -ácidos em iso- α -ácidos solúveis em água; enquanto que o rendimento da iso- α -ácidos aumenta com o tempo de ebulição, a maioria dos voláteis é perdida por evaporação. Já as cervejas de aroma são comumente alcançadas pela adição de doses múltiplas e tardias de lúpulo (ALMAGUER *et al.*, 2015).

Na indústria cervejeira, a compra do lúpulo adequado é baseada em suas características aromáticas e de amargor, sendo classificadas como "lúpulo aromático" e "lúpulo amargo". Com base no teor de α -ácido, os lúpulos de amargor são subdivididos em "lúpulos amargos", "alfa alta" e "alfa super alta". Baseado na composição e qualidade do óleo de lúpulo, o aroma do lúpulo é classificado como

“lúpulo de aroma fino” e “lúpulo de aroma”. Na época da colheita, os teores médios de α -ácidos nas variedades amargor e aroma estão na faixa de 10 a 20% e 2 para 10%, respectivamente. Uma das variedades de lúpulo de amargor comercializado no mundo é Columbus. Já algumas variedades de lúpulo aromáticas são a Hallertauer Mittelfrüh, Saaz e Cascade (ALMAGUER *et al.*, 2015; ALMAGUER *et al.*, 2014).

Dessa forma, alguns estudos estão sendo feitos relacionando a qualidade e as condições de cultivo do lúpulo, pois a qualidade pode ser afetada pelas condições climáticas na região de cultivo e o ano, o que contribuir para uma redução dos teores dos ácidos (MATSUI; INUI; FUKUI, 2016). O teor de α -ácidos é agora o critério aceito na indústria cervejeira para avaliar a qualidade do lúpulo. Quase em todo o mundo o teor de acidez de cada variedade, cada colheita de lúpulo e até mesmo cada remessa individual de lúpulo é medida. O teor de α -ácidos desempenha um papel decisivo na determinação dos preços e das quantidades compradas do comércio de lúpulo hoje (MOZNY *et al.*, 2009).

3.2.3 Atividade biológica do óleo essencial e extratos do lúpulo

Os cones de lúpulo seco e outras preparações de cone de lúpulo em *peletts* e extratos são essenciais para o sabor, aroma e amargor característicos da cerveja devido a seus ácidos amargos, óleos essenciais e flavonóides prenilados. Com isso, a composição química dos metabólitos secundários do lúpulo pode apresentar compostos diferentes de acordo com a sua plantação de origem, potencial genético, condições climáticas e solo, alterando as características finais da cerveja (ABRAM *et al.*, 2015; KARABIN *et al.*, 2015).

Não obstante, outras partes da planta como folhas e hastes também podem apresentar funções antioxidantes, antibacterianas, antivirais e até mesmo quimioterápicas. As folhas de lúpulo, por exemplo, têm sido usadas como fonte de compostos fenólicos, que apresentam bom resultado como antioxidante (ABRAM *et al.*, 2015; KARABIN *et al.*, 2015).

Resultados positivos foram apontados com extratos alcoólicos de lúpulo para tratamento de doenças como tuberculose pulmonar e silicose, mas também o extrato combinado com o de valeriana (*Valeriana officinalis*, *Valerianaceae*) apresentou

resultados positivos contra stress e insônia (ABRAM *et al.*, 2015; KARABIN *et al.*, 2015).

Devido a isso, o lúpulo foi identificado como uma planta medicinal pela Fundação Europeia para Fitoterapia e Sociedade Europeia de Psicologia Cognitiva (ESCOP), considerando o uso do lúpulo no tratamento de distúrbios mentais. Dessa forma, a identificação de substâncias foi feita como a chalcona prenilada e xanthohumol, por possuírem efeitos positivos nesses tratamentos e muitos estudos estão sendo feitos sobre esses compostos (ABRAM *et al.*, 2015; KARABIN *et al.*, 2015).

Além disso, o lúpulo era usado inicialmente para armazenamento prolongado de cerveja, pois reduzia o crescimento do *Lactobacillus*, o principal contaminante da cerveja. As propriedades conservantes do lúpulo têm sido investigadas há muitos anos e, apesar de alguns relatos sobre a atividade antibacteriana do óleo de lúpulo, os ácidos amargos parecem ser os principais compostos ativos (CLEEMPUT *et al.*, 2009).

Em contraste, as bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, são resistentes ou afetadas apenas por concentrações muito altas de ácidos de lúpulo. Algumas atividades inibitórias também têm sido relatadas para certos fungos, como as espécies *Penicillium* e *Aspergillus* (CLEEMPUT *et al.*, 2009).

Em geral, a lupulona tem maior capacidade antimicrobiana do que o humulona, que é, por sua vez, mais ativo do que isohumulona. No entanto, os principais na contribuição da preservação da cerveja são os iso- α -ácidos. Em todos os estudos, os ácidos do lúpulo podem se comportar como substâncias bacteriostáticas ou bactericidas, dependendo das condições empregadas (CLEEMPUT *et al.*, 2009).

Não o bastante, as plantas também produzem em seus metabolitos secundários características alelopáticas, que podem servir como bioherbicidas, que é uma estratégia no controle e manejo de plantas daninhas, invasão de plantas nas culturas, com o objetivo de diminuir o uso contínuo de herbicidas sintéticos que causam danos para saúde humana e ambiental. A alelopatia refere-se, então, a um fenômeno pelo qual as plantas produzem produtos naturais, derivados das vias secundárias das plantas, que inibem o crescimento de seus vizinhos (ARAGÃO *et al.*, 2017; GAOFENG *et al.*, 2018).

As plantas introduzem aleloquímicos no meio ambiente por meio da lixiviação foliar, exsudação radicular, decomposição de resíduos, volatilização e incorporação de detritos no meio ambiente. A precipitação resulta na lixiviação de produtos químicos de partes aéreas da planta doadora para o ambiente. Lixiviados e exsudatos radiculares com potente atividade biológica podem atuar como aleloquímicos e são produzidos por numerosas espécies de plantas, com grande variação encontrada em componentes químicos dentro de indivíduos examinados (PUDEŁKO; MAJCHRZAK; NAROŻNA, 2014).

A alelopatia e/ou potencial de compostos vegetais é baseada na avaliação da germinação de sementes e crescimento de plântulas da espécie-alvo. Embora esses ensaios forneçam informações gerais sobre os efeitos biológicos de aleloquímicos, eles não determinam seus mecanismos de ação. Porém, com testes citogenéticos e mutagênicos (parâmetros microscópicos), podem-se determinar os mecanismos de ação da planta, como por exemplo, aleloquímicos presentes em óleos essenciais (ARAGÃO *et al.*, 2015).

Além disso, a investigação dos efeitos biológicos em nível de plantas e célula é uma ferramenta importante para o uso e desenvolvimento de herbicidas baseados em aleloquímicos, que são de grande importância por serem considerados agentes que não causam risco à saúde humana ou ao meio ambiente (ARAGÃO *et al.*, 2015).

Entre os modelos de plantas utilizados para estudos de alelopatia, a espécie *Lactuca sativa* L., uma eudicotiledônea, pode ser destacada por ser altamente sensível e possibilitar a análise simultânea de vários compostos, exibe alta taxa de germinação (até 24 h) e é útil na análise de parâmetros citogenéticos. Além disso, os procedimentos laboratoriais para estes testes geralmente têm baixos custos operacionais e geram resultados em pouco tempo (ARAGÃO *et al.*, 2017). Da mesma forma, sementes de *Sorghum bicolor*, uma espécie monocotiledônea, vêm sendo usadas como modelo para ensaios fitotóxicos (ALVES *et al.*, 2018).

Diante da crescente busca por bioherbicidas e pelas diversas propriedades biológicas atribuídas ao *H. lupulus*, vislumbrou-se neste trabalho testar a atividade alelopática de extratos da flor (fêmea) de lúpulo. Assim, foram preparados extratos etanólicos das flores de *H. lupulus* para averiguar seus efeitos frente à germinação e crescimento radicular de sementes de alface (*L. sativa* L.) e de sorgo (*S. bicolor*).

4. METODOLOGIA

a. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DOS VOLÁTEIS POR HS-SPME

4.1.1 Obtenção das amostras de lúpulo (variedades)

As amostras utilizadas para otimizar as condições de extração dos voláteis de lúpulo por HS-SPME e posterior análise em GC-MS foram as seguintes: flor (material fresco) da variedade cascade (L1) foi cedida pelo produtor Paulo R. C. Cordeiro produzidos em Nova Friburgo – RJ (safra 2017-2018), uma amostra de lúpulo em *pellets* (L2), material importado, que foi adquirido em loja especializada em insumos cervejeiros em Belo Horizonte – MG e uma flor (seca) da variedade ‘Mantiqueira’ (L3), produzido no Brasil, foi cedida pela Empresa Brasil Kirin de São José dos Campos-SP.

4.1.2 Estudo das variáveis significativas para determinação dos compostos voláteis de lúpulo por HS-SPME-GC/MS

Inicialmente, foram estudados os parâmetros tempo e temperatura (Tabela 3) na extração de voláteis de lúpulo por HS-SPME e posterior análise em GC-MS, a fibra usada foi a DVB/CAR/PDMS (Divinilbenzeno/Carboxeno/Poldimetilsiloxano, espessura do filme de 50 µm). As análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 3 - Planejamento fatorial 2² com ponto central para otimização da extração dos constituintes do lúpulo por HS-SPME/GC-MS, utilizando fibra DVB/CAR/PDMS.

| Ensaio | Temperatura (°C) | Tempo (min) |
|-----------------|------------------|-------------|
| 1 | (-) 30 | (-) 10 |
| 2 | (+) 70 | (-) 10 |
| 3 | (-) 30 | (+) 30 |
| 4 | (+) 70 | (+) 30 |
| Ponto Central 1 | (0) 50 | 20 |
| Ponto Central 2 | (0) 50 | 20 |
| Ponto Central 3 | (0) 50 | 20 |

Para extração dos voláteis, as amostras de lúpulo foram cortadas manualmente em pequenos pedaços (0,100 g) e colocadas em frascos para *headspace* de 20 mL, rosqueadas contendo septo e colocadas no bloco de aquecimento. A fibra de SPME (DVB/CAR/PDMS) foi colocada no modo *headspace*, imediatamente, após a perfuração do septo do frasco. Após a extração, a fibra foi extraída novamente e desessorvida na porta de injeção do cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas.

Os voláteis dos lúpulos (L1, L2 e L3) após desessorvidos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) QP-PLUS-2010 (*Shimadzu*). A coluna capilar de sílica fundida usada foi a Rtx-5MS (30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno), o hélio foi usado como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 220 °C e do detector de 300 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C, sendo programada para ter acréscimos de 3 °C a cada minuto, até atingir a temperatura máxima de 240 °C. Para determinar os constituintes químicos dos voláteis dos lúpulos, os espectros de massas obtidos foram comparados com os da biblioteca do aparelho, com dados de outros trabalhos e com os índices de retenção (ADAMS, 2007; PINHEIRO et al., 2015). Para realizar o cálculo dos índices de retenção (IR), foi injetada no cromatógrafo uma mistura de alcanos lineares (C9 a C26) nas mesmas condições usadas na análise dos referidos voláteis de lúpulos.

4.1.3 Determinação dos compostos voláteis nas amostras de lúpulos após o estudo do planejamento fatorial

Outras amostras de lúpulo foram analisadas depois do estudo do planejamento fatorial e escolha das variáveis significativas para extração dos compostos voláteis. Essas amostras foram cedidas pelo produtor Paulo R. C. Cordeiro produzidos em Nova Friburgo – RJ (safra 2017-2018) e todas *in natura* da variedade: Cascade (colheita dezembro de 2017, L4), Columbus (L5), Halertau Miltfruh (L6), Saaz (colheita dezembro 2017, L7), Saaz (colheita fevereiro 2018, L8), Victoria (L9), Brazylisk (L10), Bullion (L11) e Canastra (L12).

4.2 ANÁLISES DE α E β -ÁCIDOS EM AMOSTRAS DE LÚPULOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE, SIGLA EM INGLÊS HPLC)

Para a determinação α e β -ácidos em amostras de lúpulos foi utilizada a metodologia desenvolvida por Danenhowe et al. (2008), com adaptações. A extração dos referidos ácidos foi realizada utilizando uma mistura de: 85% de metanol (grau HPLC da Sigma Aldrich): 15% de água Milliq acidificada com 0,025% de ácido fórmico. Uma quantidade de 1,00g de lúpulo foi medida, em triplicata, sendo adicionados 30 mL da solução extratora nesse material. A mistura foi agitada por uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, foi feita uma filtração, sendo o filtrado obtido transferido para um balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com a solução extratora. Uma alíquota desse extrato foi filtrada em membrana Millipore de 0,45 μ m e injetada diretamente no cromatógrafo.

As análises foram feitas por cromatografia líquida de alta eficiência, em um cromatógrafo da marca Shimadzu (modelo M10AVP), com coluna de fase reversa C-18 Shimadzu (100 mm de comprimento x 0.3 mm DI). O sistema encontrava-se acoplado a um detector espectrofotométrico UV/visível Shimadzu (modelo SPD-10A), conectado por interface (CBM-101) a um microcomputador para processamento de dados. As condições de análise utilizadas foram: fluxo de 0,8 mL/min; fase móvel: 85% de metanol (grau HPLC da Sigma Aldrich): 15% de água Milliq acidificada com 0,025% de ácido fórmico; temperatura ambiente e comprimento de onda de 326 nm (DANENHOWE et al., 2008 com adaptações).

O padrão ICE-3 (*International Calibration Extract 3*) foi comprado da empresa americana ASBC nos Estados Unidos. Para preparação dos pontos da curva foram utilizados 300 mg do padrão diluído para 50 mL de metanol acidificado com 0,025% v/v de ácido fórmico. As concentrações utilizadas de ICE-3 para a obtenção das curvas analíticas foram de: 6 mg.mL⁻¹; 3 mg.mL⁻¹; 1,5 mg.mL⁻¹; 0,75 mg.mL⁻¹; 0,375 mg.mL⁻¹ e 0,187 mg.mL⁻¹. As soluções foram todas filtradas usando filtro de seringa de nylon de 0,45 μ m e então analisadas no HPLC nas condições supracitadas (DE KEUKELEIRE et al., 2003 com adaptações).

O padrão ICE-3 apresentava em sua composição uma mistura de 13,88% de cohumulona, 30,76% de n+adhumulona, 13,44% de colupulona e 10,84% de n+adlupulona. Totalizando 44,64% de α -ácidos e 24,28% de β -ácidos (ASBC).

As amostras de lúpulo analisadas foram 14 no total. Uma amostra de lúpulo em *pellets* da variedade cascade, material importado; uma amostra seca a vácuo da variedade 'Mantiqueira' e as amostras *in natura* das variedades: Cascade (colheita dezembro de 2017), Columbus, Hallertauer Mittelfrüh, Saaz (colheita dezembro 2017), Saaz (colheita fevereiro 2018), Victoria, Brazyljisk, Bullion e Canastra.

As outras três amostras foram de lúpulos em pellets, adquiridos em lojas de insumos cervejeiros, que continham nos rótulos os valores de α e β ácidos, sendo identificadas como: Hallertauer Magnum, citra e czech premiant.

4.3 ENSAIOS DE FITOTOXICIDADE

4.3.1 Material vegetal e sementes

Para produção dos extratos foram utilizadas 11 amostras de lúpulo, sendo elas: uma de lúpulo em *pellets* da variedade cascade, material importado; uma seca a vácuo da variedade 'Mantiqueira'; e o restante foram *in natura* das variedades Cascade (colheita dezembro de 2017), Columbus, Hallertauer Mittelfrüh, Saaz (colheita dezembro 2017), Saaz (colheita fevereiro 2018), Victoria, Brazyljisk, Bullion e Canastra.

As sementes comerciais utilizadas foram as de alface, *L. sativa* (eudicotiledônea) do cultivar "Crespa Grand Rapids - TBR" da marca ISLA e de Sorgo, *S. bicolor* (monocotiledônea) do cultivar "AL precioso" e da marca Brseeds, adquiridas na casa rural de Alegre-E.S.

4.3.2 Obtenção dos extratos

Os extratos foram preparados usando 1,000g de lúpulo, cones soltos, onde foram esmagados com um almofariz e pilão manualmente com 30 mL de álcool

etílico 96%. Posteriormente, foi realizada uma filtração simples através de papel de filtro de porosidade média e recolheu-se todo o filtrado em placa de petri. O filtrado foi colocado na DBO (Demanda Bioquímica de Oxigênio) por 24 horas (60°C) para evaporação do solvente, restando somente o extrato desejado (ABRAM, et al. 2015 com modificação).

O material obtido após a extração com álcool etílico foi solubilizado em diclorometano para a obtenção das soluções em diferentes concentrações que foram usadas nos ensaios de fitotoxicidade.

4.3.3 Fitotoxicidade

Sementes de *L. sativa* e de *S. bicolor* foram utilizadas como modelos vegetais de eudicotiledônea e monocotiledônea, respectivamente. A germinação foi realizada em placas de *Petri* de 9 cm de diâmetro, forradas com papel de filtro fino e regadas com os tratamentos. Foram utilizadas quatro concentrações para cada variedade (100%; 50%; 25%; 12,5%) dos extratos obtidos. Como controle negativo utilizou-se água deionizada (osmose reversa) e o solvente utilizado no preparo das soluções foi diclorometano, e como controle positivo foi utilizado o herbicida comercial glifosato na concentração indicada pelo fabricante. As placas foram lacradas com papel filme e acondicionadas em uma câmara de germinação (DBO) a 25°C ± 2°C, onde ficaram armazenadas durante 120h (ARAGÃO et al. 2015).

O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), sendo que cada tratamento foi constituído por cinco repetições com 25 sementes cada, totalizando 470 placas de *Petri* e 11750 sementes. Analisou-se o processo de germinação em períodos de 8 em 8 horas até completar 48 horas, de modo a avaliar a porcentagem final de germinação (%G) e o índice de velocidade de germinação (IVG):

$$(N_1 \cdot 1) + (N_2 - N_1) \cdot 1/2 + (N_3 - N_2) \cdot 1/3 + \dots + (N_y - (N_{y-1})) \cdot 1/y,$$

Onde N_y representa o número de sementes germinadas no dado momento, y representa o intervalo de tempo.

Após as 48 horas, o comprimento da raiz de cada semente foi aferido, com o auxílio de um paquímetro digital, para determinar o crescimento radicular (CR) e

após 120h as partes aéreas das plântulas foram medidas para determinar o crescimento aéreo (CA) (ARAGÃO et al., 2015).

4.3.4 Análise estatística

As médias obtidas com as análises de fitotoxicidade foram avaliadas pelo teste de Dunnett com 5% de significância. As análises foram realizadas no programa estatístico GENES (CRUZ, 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS ANÁLISES HS-SPME/GC-MS

5.1.1 Estudo de metodologia para determinação de voláteis de lúpulo por HS-SPME/GC-MS

Amostras de lúpulos em flor fresco, em flor secos a vácuo e o em *pellets* foram usadas para desenvolver a metodologia de extração HS-SPME para análise em GC-MS de seus constituintes voláteis. O lúpulo em flor é a forma mais simples do lúpulo, usado na forma que é coletado nas plantações, na forma *in natura*. O lúpulo em flor seco a vácuo difere do em flor fresco pela retirada de toda a umidade presente na planta, sendo menos perecível e volumoso. Por fim, os lúpulos em *pellets* são feitos pelo processo de pelletização que produz um pó formando posteriormente os *pellets*, que são mais homogêneos, estáveis e com custos menores para armazenamento e transporte (HAAS, 2013).

5.1.2 Obtenção dos cromatogramas e espectro de massas dos compostos voláteis do lúpulo

Os cromatogramas obtidos das 3 amostras foram apresentados na Figura 9, para L1 e L2 os compostos majoritários (maiores % em área) encontrados foram: mirceno, cariofileno, farneseno e humuleno. Para o L3, os majoritários foram: o mirceno, cariofileno, farneseno, mas não foi identificada a presença do composto humuleno. Farag (2012) relatou de forma similar que os óleos essenciais são os principais componentes aromáticos do lúpulo com mirceno (30–50%), humuleno (15–25%) e cariofileno como principais componentes monoterpenos e sesquiterpenos.

O teor e a composição dos voláteis na planta podem estar associados a diversos fatores como temperatura, luminosidade, sazonalidade estágio de desenvolvimento da planta, horário da colheita e nutrição da planta (KHALID; EL-GOHARY, 2014).

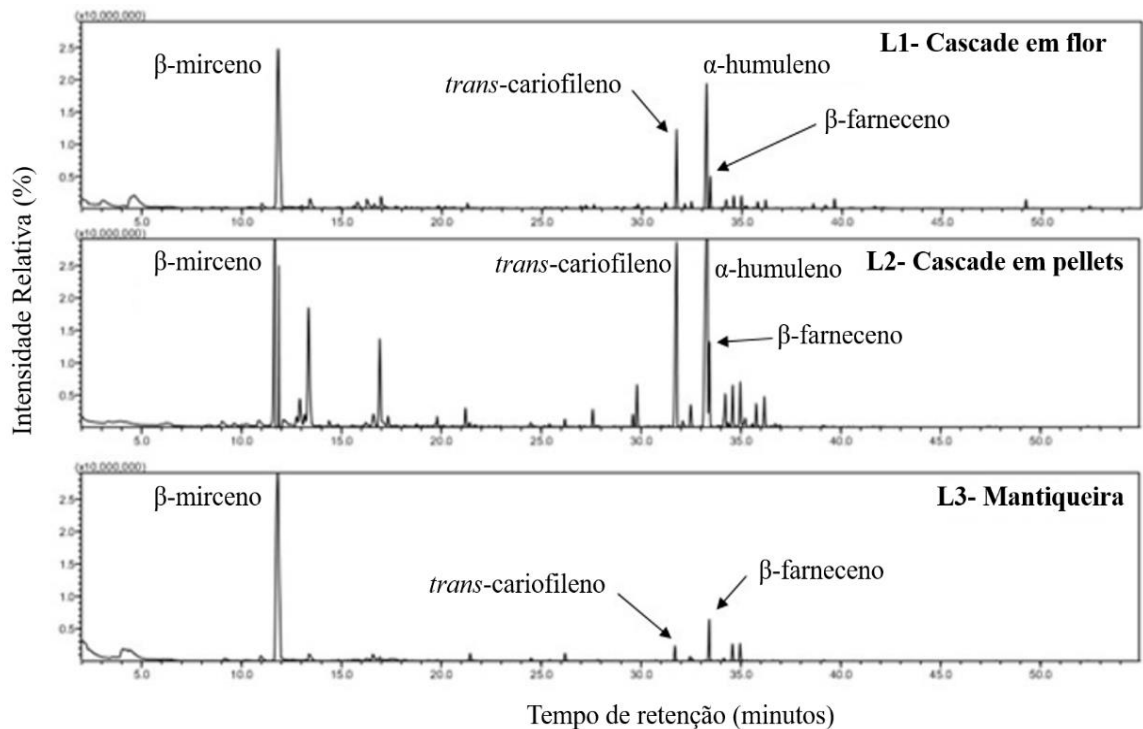


Figura 9 - Cromatogramas de íons totais das amostras de lúpulos em flor da variedade cascade (L1), cascade em *pelletes* (L2) e em flor da variedade 'Mantiqueira' (L3).

5.1.3 Planejamento fatorial 2^2 - estudo das variáveis significativas para determinação dos compostos voláteis de lúpulo por HS-SPME/GC-MS

A Tabela 4 mostra os dados da matriz de contraste construída para a realização do planejamento 2^2 com ponto central para obtenção das melhores condições de extração nas amostras de lúpulos avaliadas. As análises foram realizadas com triplicata do ponto central.

Tabela 4 - Planejamento fatorial 2² dos compostos mirceno, cariofileno, humuleno e farneceno.

| PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ² | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------------------------|-------|-----------|-------|-------|-------------------|-------|------|------------|-------|-----|-------------|------|-------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Variáveis | | Área | | | | | | | | | | | | Área normalizada % L1 | Área normalizada % L2 | Área normalizada % L3 |
| | | β-Mirceno | | | trans-Cariofileno | | | α-Humuleno | | | β-Farneceno | | | | | |
| Temp. | Tempo | L1 | L2 | L3 | L1 | L2 | L3 | L1 | L2 | L3 | L1 | L2 | L3 | - | - | - |
| - | - | 42,8 | 16,37 | 80,98 | 9,61 | 17,34 | 2,31 | 17,45 | 25,15 | 0 | 3,44 | 3,33 | 6,42 | 2,69 | 3,40 | 1,56 |
| - | + | 19,14 | 10,26 | 54,43 | 11,99 | 18,65 | 4,3 | 21,24 | 30,83 | 0 | 5,79 | 4,26 | 16,18 | 2,70 | 3,48 | 1,85 |
| + | - | 6,86 | 8,62 | 67,2 | 6,7 | 19,87 | 3,3 | 11,73 | 33,46 | 1,1 | 0 | 0 | 7,9 | 1,06 | 2,52 | 2,59 |
| + | + | 7,31 | 6,13 | 14,55 | 4,02 | 15,79 | 4,62 | 9,25 | 25,47 | 0 | 2,56 | 0 | 31,21 | 1,08 | 1,92 | 1,89 |
| 0 | 0 | 14,46 | 9,37 | 72,27 | 14,88 | 18,37 | 3,58 | 26,05 | 30,11 | 0 | 9,14 | 3,76 | 9,48 | 3,34 | 3,27 | 1,74 |
| 0 | 0 | 21,51 | 7,86 | 38,94 | 13,7 | 17,44 | 6,54 | 24,55 | 32,14 | 0 | 8,59 | 0 | 19,3 | 3,31 | 2,31 | 2,10 |
| 0 | 0 | 33,01 | 8,61 | 59,28 | 13,41 | 19,13 | 6,3 | 23,67 | 33,81 | 0 | 7,84 | 0 | 13,34 | 3,44 | 2,49 | 2,12 |

Os efeitos das variáveis significativas da extração de voláteis em amostras de lúpulo por GC-MS foram avaliados usando a análise de variância (ANOVA) e gráficos de Pareto. Para obter uma condição que satisfaça a extração simultânea das quatro espécies voláteis majoritárias, os dados foram normalizados segundo a Equação 1, onde R = resposta de cada condição para um determinado analito e HS é a maior resposta para cada analito (LOPES *et al.*, 2009).

$$OR = \frac{R_{(\beta\text{-myrcene})}}{HS_{(\beta\text{-myrcene})}} + \frac{R_{(\text{trans-Caryophyllene})}}{HS_{(\text{trans-Caryophyllene})}} + \frac{R_{(\alpha\text{-humulene})}}{HS_{(\alpha\text{-humulene})}} + \frac{R_{(\beta\text{-farnecene})}}{HS_{(\beta\text{-farnecene})}} \quad \text{Equação 1.}$$

Com as áreas normalizadas (Tabela 4), foram obtidos os gráficos de Pareto das amostras L1 (variedade cascade, *in natura*), L2 (variedade cascade, pellets) e L3 (variedade mantiqueira, em flor seca a vácuo). As variáveis do método de extração foram analisadas individualmente em temperatura (1), tempo (2) e juntas temperatura e tempo (1by2) mostradas nas Figuras 10, 11 e 12.

O gráfico de Pareto foi construído para verificar as variáveis e os efeitos mais significativos para o método estudado ao nível de 95% de confiança.

Analisando as variáveis independentes da Figura 10, observa-se que a variável temperatura de extração (1) foi significativa, em menor nível, somente para a amostra de Lúpulo em Flor (L1), e o tempo de extração (2) não apresentou uma resposta significativa, pois a faixa horizontal não ultrapassou a linha de 95% de confiança. Para o estudo das interações de duas variáveis, a interação entre o tempo de extração e a temperatura de extração (1 by 2) também não foram significativas.

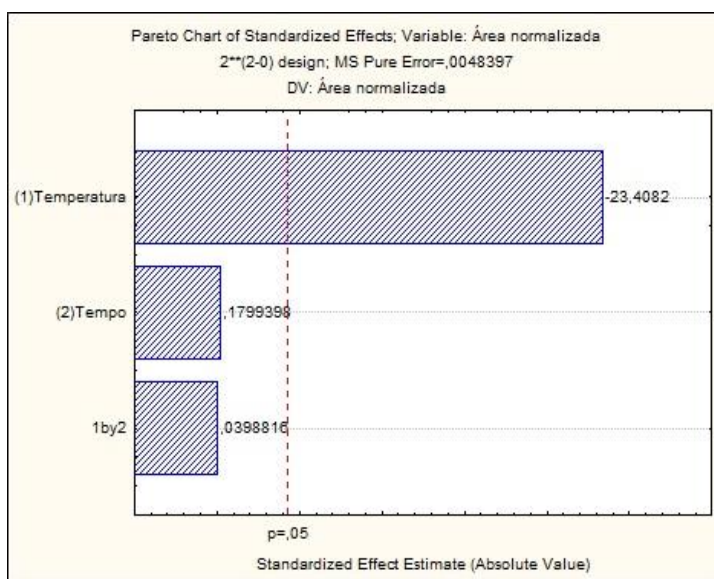


Figura 10 - Gráfico de Pareto da amostra L1.

Nas Figuras 11 e 12, as variáveis, temperatura, tempo e a interação das duas variáveis não foram significativas indicando que se deve trabalhar em faixas mais próximas dos menores valores escolhidos no planejamento.

Dessa forma, considerando os resultados obtidos escolheu-se trabalhar com menor tempo de extração de 10 minutos, para obtenção de análises mais rápidas. Como temperatura de extração foi significativa para o nível mais baixo na amostra L1, e não apresentou resposta significativa para as amostras L3 e L2, escolheu-se trabalhar com a menor temperatura utilizada no experimento, de 30 °C.

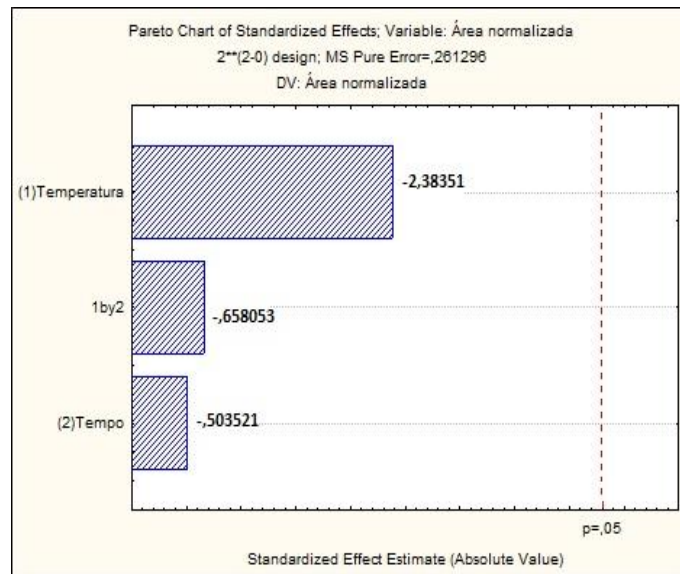


Figura 11 - Gráfico de Pareto da amostra L2.

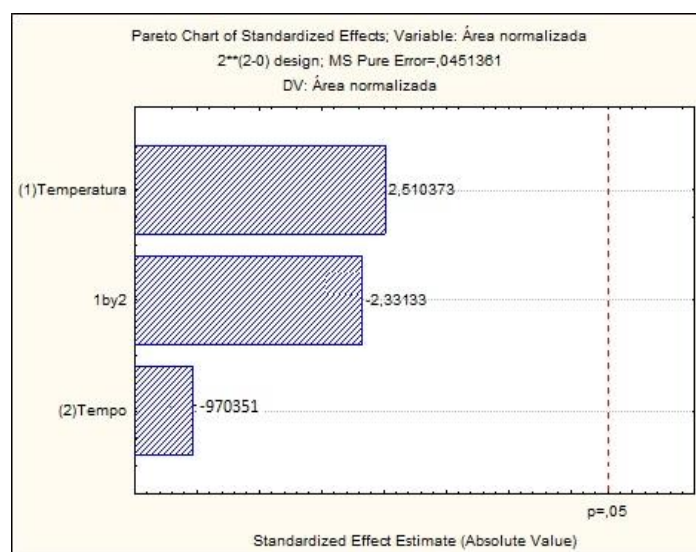


Figura 12 - Gráfico de Pareto da amostra L2.

5.1.4 Aplicação do planejamento fatorial para determinação dos compostos voláteis nas amostras de lúpulo.

Considerando os parâmetros otimizados em tempo (10 minutos) e temperatura (30 °C) adequados na extração dos voláteis do lúpulo, as outras 9 amostras de lúpulo em flor foram analisadas por HS-SPME/GC-MS. Foram encontrados 25 compostos classificados como: monoterpenos hidrocarbonetos, monoterpenos oxigenados e sesquiterpenos hidrocarbonetos (KASKONAS, et al, 2016).

De acordo com a Tabela 5, os compostos mirceno e farneseno foram identificados em todas as 12 variedades. O cariofileno não foi identificado somente nas variedades L6 e L8 e o humuleno também não foi identificado nessas variedades além de não identificado nas variedades L7 e em L3.

Na literatura, a variedade cascade apresenta o composto mirceno na faixa de 45 - 60%, cariofileno na faixa de 3,5 – 5,5%, humuleno 8,0 - 13% e farneseno 3,0 – 7,0% (VARIETY MANUAL HOP GROWERS OF AMÉRICA, 2018). Comparando as mesmas variedades de diferentes datas de colheita, observou-se diferença nos compostos identificados. Na variedade L1, foram identificados 4 compostos, já nas variedades L2 e a L4 foram encontrados 14 compostos. A variedade L2 foi o que apresentou a menor área do composto mirceno de 16,37% e apresentou uma significativa área do composto limoneno de 10,85%, que foi identificado apenas nas variedades L4 e L3 com áreas de 1,82% e 1,85% mostrados na Tabela 5.

Comparando-se os principais compostos voláteis identificados do lúpulo da variedade cascade colhido no inverno brasileiro (L1), percebeu-se que a quantidade de voláteis detectados por HS-SPME/GC-MS para mirceno, cariofileno, humuleno e farneseno foi de 94,6%, 0,63 %, 2,19% e 0,96%, respectivamente. Para a amostra colhida no verão brasileiro (L4), a porcentagem dos mesmos compostos anteriormente citados foram, respectivamente, 42,8%, 9,6%, 17,4% e 3,44%.

A variedade Columbus (L5), de acordo Great Lakes Hops (2018), apresenta mirceno na faixa de 25-45%, humuleno 15-25% e cariofileno 8-12%. Contudo, nas análises feitas com essa variedade brasileira (Tabela 5), mostrou-se uma maior quantidade de mirceno com área de 76,23%, humuleno 6,67%, cariofileno 8,35% e

identificou-se uma pequena quantidade de farneseno de 0,95% que não foi descrita na literatura.

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, a variedade Hallertauer Mittelfrüh (L6) apresenta mirceno 40,2%, cariofileno 9,9%, Humuleno 33,9% e nenhum farneseno. Porém, na análise feita, identificou-se uma área de 59,3% do composto mirceno, não foram identificados os compostos cariofileno e humuleno, e o farneseno foi identificado com uma área relativa de 5,94%.

A variedade saaz, de acordo com a literatura, apresenta mirceno na faixa de 25 - 30%, cariofileno 9,0 - 11%, humuleno 35 - 40%, farneseno 9,0 - 13% (VARIETY MANUAL HOP GROWERS OF AMÉRICA, 2018). Com duas amostras de 2 colheitas diferentes, a variedade saaz (L7 e L8) apresentou maior similaridade, já que o intervalo da colheita foi menor comparado com a variedade cascade descrita anteriormente.

Tabela 5 - Compostos químicos dos voláteis de *Humulus lupulus* L.

| No. | Composto | IR | GC área do pico (%) | | | | | | | | | | | | Aroma |
|--------------------------------|-------------------------|------|---------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|
| | | | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | L6 | L7 | L8 | L9 | L10 | L11 | L12 | |
| 1 | β -Pinenos | 980 | - | - | 1,51 | 1,0 | - | - | - | - | - | - | - | - | Madeira de pinheiro |
| 2 | β -Miraceno | 991 | 94,6 | 16,4 | 81,0 | 42,8 | 76,2 | 56,3 | 88,0 | 73,0 | 87,0 | 73,6 | 96,0 | 84,6 | Resina, pinho, ervas |
| 3 | Limoneno | 1031 | - | 10,8 | 1,8 | 1,8 | - | - | - | - | - | - | - | - | Laranja, cítrico |
| 4 | trans- β -Ocimeno | 1044 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 2,6 | - | - | Ervadoce |
| 5 | NI | 1080 | - | - | - | 1,8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 6 | Linalool | 1095 | - | 6,9 | - | 1,8 | 2,0 | - | - | - | 2,5 | 2,5 | - | - | Floral |
| 7 | α -Terpineol | 1189 | - | - | - | - | - | 5,8 | - | - | - | - | - | - | Cítrico, amadeirado |
| 8 | α -Terpinoleno | 1188 | - | - | - | - | - | - | - | 2,1 | - | - | - | - | Cítrico, doce |
| 9 | Decan-2-ona | 1192 | - | - | 0,80 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Floral |
| 10 | Undecan-2-ona | 1291 | - | - | 1,0 | - | - | 2,3 | - | 2,1 | - | - | - | - | Fruitado |
| 11 | α -Ylangeno | 1372 | - | 0,6 | - | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 12 | α -Copaeno | 1376 | - | 1,9 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | Amadeirado, picante |
| 13 | Acetato de Geranila | 1383 | - | - | - | - | 1,7 | - | - | - | - | - | - | - | Floral, cítrico |
| 14 | cis-Cariofileno | 1404 | - | - | - | 0,6 | - | - | - | - | - | - | - | - | Cravo |
| 15 | trans-Cariofileno | 1418 | 0,6 | 17,3 | 2,3 | 9,6 | 8,3 | - | 1,4 | - | 1,3 | 3,4 | 0,7 | 1,6 | Picante, lenhoso, Cravo |
| 16 | α -Bergamoteno | 1436 | - | 1,5 | - | 0,6 | - | - | - | - | - | - | - | - | Arborizado |
| 17 | α -Humuleno | 1454 | 2,2 | 25,1 | - | 17,4 | 6,7 | - | - | - | 5,1 | 6,7 | 2,3 | 4,6 | Herbal, picante, lenhoso |
| 18 | β -Farneseno | 1458 | 1,0 | 3,3 | 6,4 | 3,4 | 0,9 | 5,9 | 7,4 | 9,8 | 2,1 | 5,0 | 0,5 | 2,1 | Toranja |
| 19 | β -Chamigreno | 1475 | - | - | - | - | - | 5,7 | - | 3,3 | - | - | - | - | - |
| 20 | β -Selineno | 1485 | - | 2,4 | 2,6 | 1,4 | 0,4 | - | 1,9 | - | - | 1,5 | - | - | Ervas |
| 21 | Valenceno | 1491 | - | - | - | - | 0,4 | - | - | - | - | - | - | - | Cítrico, fruitado |
| 22 | α -Selineno | 1494 | - | 2,4 | 2,5 | 1,4 | - | - | 1,8 | - | - | 2,2 | - | - | Âmbar |
| 23 | δ -Cadineno | 1524 | - | 1,8 | - | 0,8 | 0,9 | - | - | - | - | - | - | - | Tomilho, ervas |
| 24 | γ -Cadineno | 1513 | - | 1,3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 25 | NI | 1473 | - | 1,8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Monoterpenos Oxigenados | | | - | 6,9 | 0,8 | 1,8 | 3,8 | 5,8 | - | - | 2,5 | 2,5 | - | - | |
| Monoterpenos Hidrocarbonetos | | | 94,6 | 27,2 | 84,3 | 45,6 | 76,2 | 59,3 | 88,0 | 75,1 | 87,0 | 76,2 | 96,0 | 84,6 | |
| Sesquiterpenos Hidrocarbonetos | | | 3,8 | 59,6 | 13,8 | 35,7 | 17,6 | 11,6 | 12,5 | 13,1 | 8,5 | 18,8 | 3,5 | 8,3 | |
| Outros Compostos | | | - | - | 1,0 | 1,8 | - | 2,3 | - | 2,1 | - | - | - | - | |
| Total (%) | | | 98,4 | 93,7 | 99,9 | 84,9 | 97,6 | 79,0 | 100,5 | 90,3 | 98,0 | 97,5 | 99,5 | 92,9 | |

Os compostos são listados por ordem de eluição na coluna Rtx-5MS, IR: índice de retenção, Cascade colhida em julho de 2017 (L1); Cascade em *Pellets* (L2); Mantiqueira do Brasil Kirin (L3); Cascade colhida em dezembro de 2017 (L4); Columbus (L5); Hallertauer Mittelfrüh (L6); Saaz colhida em dezembro de 2017 (L7); Saaz colhida em fevereiro de 2018 (L8); Victoria (L9); Brazylik (L10); Bullion (L11); Canastra (L12).

Análises dos principais componentes foram realizadas para agrupar as variedades, utilizando exames visuais em dispersões gráficas e apresentadas no gráfico de heatmap. A Figura 13 mostra o gráfico de heatmap com a percentagem da área do pico calculada por cromatografia gasosa, sendo representado pela intensidade da cor, de azul claro a azul escuro. O composto mirceno apresenta um azul escuro mais intenso por ter apresentado uma maior área (que é mostrado na Tabela 5).

| Compound | | GC área do pico (%) | | | | | | | | | | | | AROMA |
|----------|--------------------------------|---------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|---------------------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | |
| | | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | L6 | L7 | L8 | L9 | L10 | L11 | L12 | |
| 1 | beta-Pineno | | | | | | | | | | | | | Madeira de |
| 2 | beta-Mirceno | | | | | | | | | | | | | Picante, frutado |
| 3 | dl-Limoneno | | | | | | | | | | | | | Laranja, cítrico |
| 4 | trans-beta-Ocimeno | | | | | | | | | | | | | Erva doce |
| 5 | NI | | | | | | | | | | | | | - |
| 6 | Linalol | | | | | | | | | | | | | Cítrico,Floral |
| 7 | alfa-Terpineol | | | | | | | | | | | | | Cítrico, amadeirado |
| 8 | alfa-Terpinoleno | | | | | | | | | | | | | Cítrico, doce |
| 9 | 2-Decanona | | | | | | | | | | | | | Floral |
| 10 | 2-Undecanona | | | | | | | | | | | | | Frutado |
| 11 | alfa-Ylangeno | | | | | | | | | | | | | - |
| 12 | alfa-Copaeno | | | | | | | | | | | | | Amadeirado, picante |
| 13 | Acetato de Geranila | | | | | | | | | | | | | Floral, cítrico |
| 14 | cis-Cariofileno | | | | | | | | | | | | | Cravo |
| 15 | trans-Cariofileno | | | | | | | | | | | | | Cravo |
| 16 | alfa-Bergamoteno | | | | | | | | | | | | | Arborizado |
| 17 | alfa-Humuleno | | | | | | | | | | | | | Herbal, picante |
| 18 | beta-Farneseno | | | | | | | | | | | | | Toranja |
| 19 | beta-Chamigreno | | | | | | | | | | | | | - |
| 20 | beta-Selineno | | | | | | | | | | | | | Ervas |
| 21 | Valenceno | | | | | | | | | | | | | Cítrico, frutado |
| 22 | alfa-Selineno | | | | | | | | | | | | | Ambar |
| 23 | delta-Cadineno | | | | | | | | | | | | | Tomilho, ervas |
| 24 | gama-Cadineno | | | | | | | | | | | | | - |
| 25 | alfa-Amorphene | | | | | | | | | | | | | - |
| 26 | Monoterpenos Oxigenados | | | | | | | | | | | | | - |
| 27 | Monoterpenos Hidrocarbonetos | | | | | | | | | | | | | - |
| 28 | Sesquiterpenos Oxigenados | | | | | | | | | | | | | - |
| 29 | Sesquiterpenos Hidrocarbonetos | | | | | | | | | | | | | - |
| 30 | Outros compostos | | | | | | | | | | | | | - |

Figura 13 – Gráfico de heatmap da porcentagem da área de pico calculada em cromatografia gasosa representada pela intensidade da cor.

*Cascade colhida em julho de 2017 (L1); Cascade em pellets (L2); Mantiqueira do Brasil Kirin (L3); Cascade colhida em dezembro de 2017 (L4); Columbus (L5); Hallertauer Mittelfrüh (L6); Saaz colhida em dezembro de 2017 (L7); Saaz colhida em fevereiro de 2018 (L8); Victoria (L9); Brazylisk (L10); Bullion (L11); Canastra (L12).

Na Figura 14, temos o diagrama de dispersão feito a partir das áreas em relação aos principais grupos formados pelas 12 variedades de lúpulo.

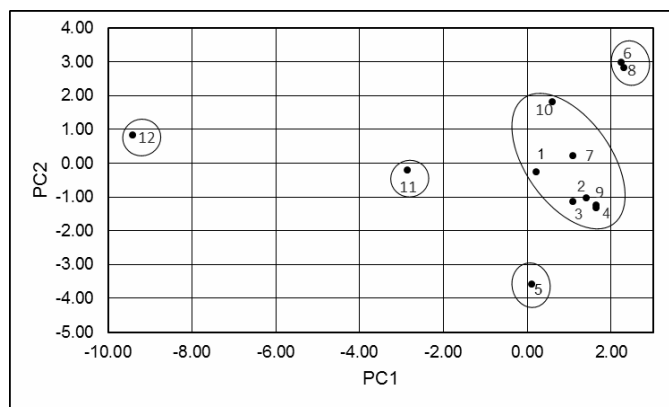


Figura 14 - Diagrama de dispersão em relação aos principais grupos formados das 12 amostras de diferentes variedades de lúpulo.

*Cascade colhida em julho de 2017 (L1); Cascade em pellets (L2); Mantiqueira do Brasil Kirin (L3); Cascade colhida em dezembro de 2017 (L4); Columbus (L5); Hallertauer Mittelfrüh (L6); Saaz colhida em dezembro de 2017 (L7); Saaz colhida em fevereiro de 2018 (L8); Victoria (L9); Brazylisk (L10); Bullion (L11); Canastra (L12).

Foi observado pela análise dos componentes principais (Figura 14), que, com base nas respectivas coordenadas relacionadas aos dois primeiros componentes principais, CP1 e CP2, sugere a existência de cinco grupos homogêneos. O primeiro grupo é formado pela variedade 12 (Canastra), o segundo grupo pela variedade 11 (Bullion), o terceiro grupo pela variedade 5 (Columbus), a quarta pelas variedades 6 e 8 (Hallertauer Mittelfrüh e Saaz colhida em fevereiro de 2018, respectivamente) e, finalmente, o quinto grupo formado pelas outras variedades. Esses resultados também podem ser confirmados no gráfico heatmap (Figura 13), que mostra uma matriz azul semelhante por grupo homogêneo formado por compostos voláteis. Já na Tabela 6 temos a percentagem acumulativa de 56,83%, representando um valor considerável com relação às divisões dos grupos.

Tabela 6 - Principais componentes, seus respectivos autovalores e percentuais simples e acumulados da variância total em relação às variedades de lúpulo.

| Componente principal | Autovalores | Porcentagem simples | Porcentagem acumulada |
|----------------------|-------------|---------------------|-----------------------|
| CP1 | 10,61161 | 42,45 | 42,45 |
| CP2 | 3,595722 | 14,38 | 56,83 |

As amostras de lúpulo L1, L2, L4, todas as variedades Cascade, foram ajuntadas no mesmo grupo, embora as amostras de Saaz tenham sido colhidas em dezembro de 2017 e Saaz colhidas em fevereiro de 2018 pertenceram a diferentes grupos. A variação de voláteis em plantas ocorre em função de vários fatores e pode alterar no momento da coleta, período chuvoso ou período seco, devido a fatores nutricionais, luminosidade e época de colheita (MORAIS, 2009).

Em um estudo sobre o volátil lúpulo Saaz, na região de Saaz, na República Tcheca, foram verificados os efeitos da colheita na composição dos monoterpenos linalol, geraniol e mirceno, que contribuem para o aroma do lúpulo da cerveja. Estes constituintes aumentaram com o atraso da colheita. Ou seja, houve influência da época de colheita na qualidade do aroma e intensidade do lúpulo Saaz (MATSUI, INUI, OKA, FUKUI, 2016).

Essas diferenças na composição dos voláteis podem ser causadas por vários fatores, como genética, tempo de maturação, geografia, fatores ambientais, métodos de extração usados para obter os voláteis; estação do ano em que o lúpulo foi colhido, procedimentos pós-colheita, como amadurecimento, processamento de lúpulo (pelotização) e método de armazenamento (KASKONAS, et al., 2016; RETTBERG, BIENDL, GARBE, 2018).

Na Figura 15, temos o diagrama de dispersão em relação aos principais componentes voláteis. A análise dos componentes principais sugere a existência de dois grupos homogêneos: o grupo A formado pelo composto volátil 2 (β -mirceno) e o grupo B formado pelos demais compostos voláteis. Esses resultados também podem ser confirmados pelo gráfico de heatmap, que mostra um tom mais escuro do composto volátil β -mirceno em relação aos outros compostos. Já na Tabela 7, temos que a percentagem acumulativa foi de 99,48%, mostrando um valor indiscutível com relação às divisões dos grupos.

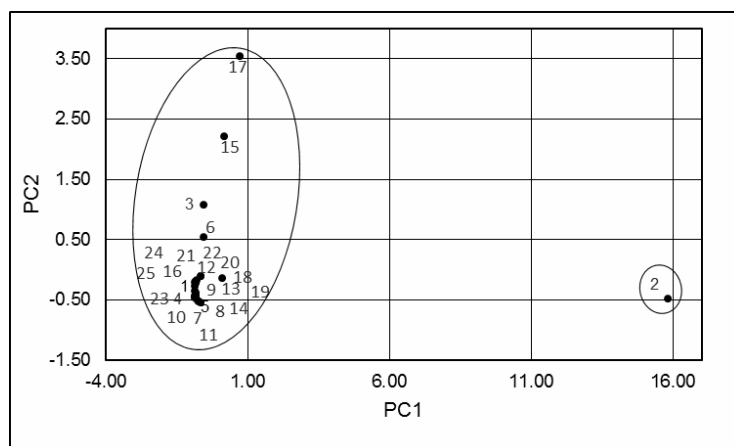


Figura 15 – Diagrama de dispersão em relação aos principais componentes de 25 componentes voláteis.

*Cascade colhida em julho de 2017 (L1); Cascade em pellets (L2); Mantiqueira do Brasil Kirin (L3); Cascade colhida em dezembro de 2017 (L4); Columbus (L5); Hallertauer Mittelfrüh (L6); Saaz colhida em dezembro de 2017 (L7); Saaz colhida em fevereiro de 2018 (L8); Victoria (L9); Brazylisk (L10); Bullion (L11); Canastra (L12).

Tabela 7 - Principais componentes, seus respectivos autovalores e percentuais simples e acumulados da variância total em relação aos compostos voláteis de lúpulo.

| Componente principal | Autovalores | Porcentagem simples | Porcentagem acumulada |
|----------------------|-------------|---------------------|-----------------------|
| CP1 | 11,01983 | 91,83 | 91,83 |
| CP2 | 0,9185959 | 7,65 | 99,48 |

O β -mirceno é descrito como um dos principais constituintes voláteis do lúpulo e dá o aroma "verde" à cerveja, mas também é encontrado no lúpulo seco (ALMAGUER, et al., 2014). Este composto foi encontrado como principal em quase todas as amostras de lúpulo do presente trabalho, mas em L2 (Cascade *pellets*) foi encontrado em menor quantidade em relação aos demais compostos. Isso pode ter ocorrido devido ao processamento do lúpulo, além disso, esses lúpulos foram importados e cultivados em outra região.

Almaguer et al. (2014) relatou, e como foi citado anteriormente, o uso de β -mirceno na produção de várias fragrâncias (citril, mentol, citronelal, geraniol e nerol), por ser muito volátil, a ebulição prolongada pode causar a evaporação de todo o β -mirceno, e pouco resta em cerveja.

Não há relatos sobre a composição química dos voláteis de lúpulo cultivados no Brasil, este é o primeiro estudo. Com base nos resultados, pode-se afirmar que as variedades de lúpulo cultivadas no Brasil, um país tropical, apresentaram constituintes voláteis já reportados para o lúpulo cultivado em países de clima temperado. Há relatos afirmando que tem sido possível produzir lúpulo no Brasil, em várias regiões, portanto há um grande potencial de expansão do plantio de *H. Lupulus* no Brasil, mesmo que seja para servir as cervejarias artesanais. Com esses resultados, foi possível comprovar que o lúpulo cultivado no Brasil pode apresentar características aromáticas semelhantes ao lúpulo importado.

5.2 QUANTIFICAÇÃO DOS A E B ÁCIDOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA E ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

5.2.1 Curva Analítica, ICE-3

Para determinação das concentrações dos α e β -ácidos, das variedades de lúpulo, foram feitas inicialmente quatro curvas analíticas, com o extrato de calibração internacional (ICE-3) que continha: 13,88% de cohumulona, 30,76% de n+adhumulona, 13,44% de colupulona e 10,84% de n+adlupulona, Os cromatogramas do padrão estão em anexo 1 e as curvas analíticas estão descritas abaixo (fig. 14, 15, 16 e 17),

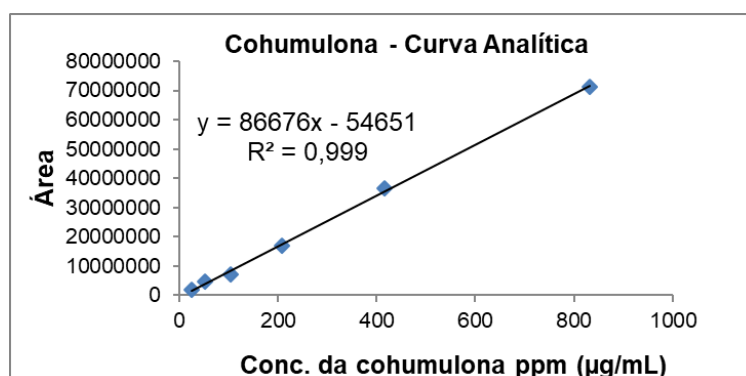


Figura 16 - Curva padrão do ICE-3 cohumulona.

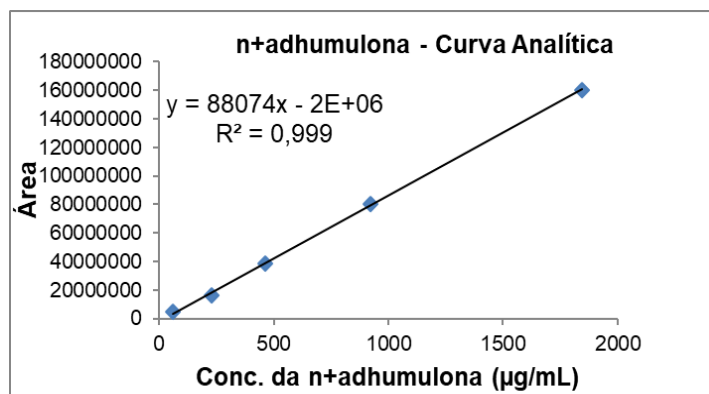


Figura 17 - Curva padrão do ICE-3 n+adhumulona.

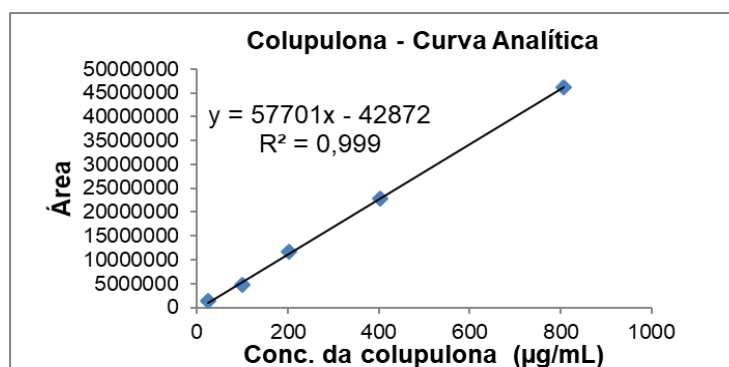


Figura 18 - Curva padrão do ICE-3 colupulona.

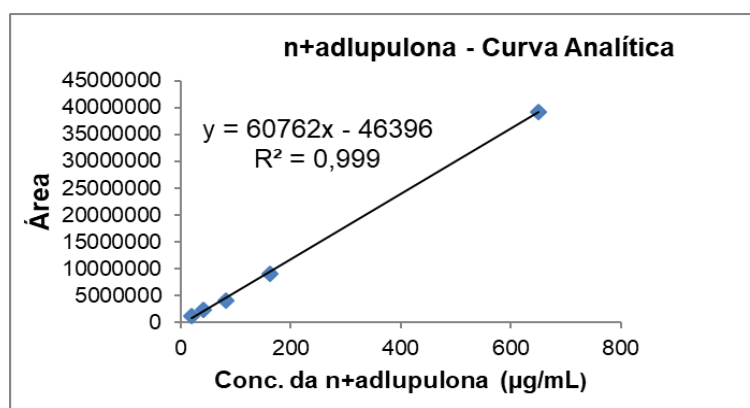


Figura 19 - Curva padrão do ICE-3 n+adlupulona.

5.2.2 Quantificação α e β -ácidos do lúpulo brasileiro e de lúpulo comercial

As variedades de lúpulo foram numeradas de 1 a 11 mostradas na Tabela 8, com a quantificação dos α ácidos cohumulona e n+adhumulona (humulona + adhumulona) e dos β ácidos colupulona e n+adlupulona (lupulona + adupulona). Os cromatogramas das amostras estão em anexo 2, a ordem de eluição e as médias dos tempos de retenção das variedades foram: cohumulona (t_R : 16,052 min), n+adhumulona (t_R : 19,327 min), colupulona (t_R : 23,774 min) e n+adlupulona (t_R : 29,998 min). Os tempos de retenção dos padrões foram similares aos encontrados para os das variedades de lúpulo.

As variedades testadas foram a *in natura*, com exceção da variedade 1 que foi em *pellets* e a 3 que foi seca a vácuo. Dessa forma, os respectivos cálculos de umidade das variedades *in natura* foram corrigidos.

Na Tabela 8, estão descritos os resultados dos α e β -ácidos das variedades de lúpulo, que diferem de cultivar para cultivar, devido a muitos parâmetros, tais como o seu local de origem, clima, crescimento, pós-colheita e condições de armazenamento, entre outros (BERTELLI et al., 2018).

Tabela 8 - Quantificação dos α e β ácidos (Cohumulona, n+adhumulona, colupulona e n+adlupulona) das 11 variedades de lúpulo dado em % (g/100g de lúpulo seco).

| Variedades | α -ácidos | | β -ácidos | |
|--------------------|------------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Cohumulona % | n+adhumulona % | Colupulona % | n+adlupulona % |
| 1-Cascade(pellets) | 0,56 | 1,47 | 2,06 | 2,17 |
| 2-H, Miltfruh | 0,34 | 1,04 | 0,32 | 0,43 |
| 3-Mantiqueira | 0,39 | 0,91 | 0,53 | 0,36 |
| 4-Victoria | 0,57 | 2,11 | 0,85 | 0,81 |
| 5- Canastra | 0,08 | 1,98 | 1,19 | 1,17 |
| 6- Saaz 1* | 0,44 | 1,51 | 0,58 | 0,66 |
| 7- Saaz 2* | 0,21 | 0,88 | 0,36 | 0,36 |
| 8- Cascade | 0,56 | 1,27 | 0,68 | 0,57 |
| 9- Columbus | 1,37 | 3,61 | 1,28 | 0,91 |
| 10- Brazylisk | 0,22 | 1,19 | 0,63 | 1,14 |
| 11- Bullion | 0,89 | 2,19 | 0,91 | 0,94 |

*Saaz 1: Colhido em 18/12/17 Saaz 2: Colhido em 10/02/18

Na Tabela 9, estão descritos a percentagem dos α e β -ácidos totais das variedades de lúpulo analisadas. Os dados foram discutidos com base nessa tabela devido à falta de referencial teórico para tratar dos compostos obtidos separadamente, que estão descritos na Tabela 8.

Tabela 9 - Percentual de ácidos totais (α e β -ácidos) nas variedades de lúpulo.

| Variedades | ÁCIDOS TOTAIS (%) | |
|---------------------|-------------------|----------------|
| | α ácidos | β ácidos |
| 1-Cascade (pellets) | 2,03 | 4,23 |
| 2-H. Miltfruh | 1,37 | 0,74 |
| 3-Mantiqueira | 1,30 | 0,89 |
| 4-Victoria | 2,68 | 1,66 |
| 5- Canastra | 2,06 | 2,37 |
| 6- Saaz 1* | 1,96 | 1,23 |
| 7- Saaz 2* | 1,09 | 0,71 |
| 8- Cascade | 1,83 | 1,25 |
| 9- Columbus | 4,98 | 2,18 |
| 10- Brazylisk | 1,40 | 1,76 |
| 11- Bullion | 3,09 | 1,84 |

*Saaz 1: Colhido em 18/12/17 Saaz 2: Colhido em 10/02/18

Ao analisar os dados de uma mesma variedade, como da variedade cascade em pellets e a cascade *in natura*, houve uma maior diferença nos β -ácidos, com o em pellets apresentando um valor 3 vezes maior, de 1,25% para 4,23% de β -ácidos.

Quando falamos das duas variedades saaz com colheitas em datas diferentes, mas ambas *in natura*, a saaz 1 apresentou os valores de α e β ácidos totais um pouco maiores, (Tabela 9) com 1,96% de α -ácidos e 1,23% β -ácidos, já saaz 2 obteve-se 1,09% α ácidos e 0,71% de β ácidos. Mozny et al (2009) relatou que os lúpulos da variedade Saaz são caracterizados por um delicado aroma de lúpulo e um conteúdo equilibrado de α e β -ácidos. A composição das resinas de lúpulo é específica por ser relativamente baixa, com α -ácidos na faixa de 2,5 a 6,5%.

Bertelli et al. (2018) mostrou que os valores obtidos para α ácidos variaram de 11,2 a 86,3 mg.g⁻¹, enquanto o conteúdo total de β -ácido pode variar de 19,6 a 35,1

mg.g⁻¹, em variedades como a H, Herkules, Columbus, Simcoe e Centennial. A quantidade de β-ácidos é normalmente menor do que os α ácidos e a proporção de α para β ácidos depende da variedade de lúpulo analisada (BAMFORTH, 2016).

Para Krofta e Mikyska (2014) e para Olsovska et al. (2016), o percentual médio m/m de α ácidos ficaria entre 2 e 17% e β ácidos entre 2 a 10%. Já Pistelli et al. (2018) relatou concentrações de α-ácidos de 3,11% m/m à 14,78% m/m e β-ácidos de 2,69% à 4,82%, em lúpulo Polonês.

Com base nos dados da literatura, podemos observar que os valores encontrados nas variedades de lúpulo brasileiro foram abaixo do esperado em todas as variedades. Com o objetivo de verificar os dados obtidos, foram feitas as mesmas análises para amostras de lúpulo comercial que possuíam nos rótulos as porcentagens dos α e β-ácidos totais.

Na Tabela 10, obteve-se a percentagem em g/100g de lúpulo seco de cohumulona, n+adhumulona, colupulona e n+adlupulona. Contudo, os resultados foram discutidos a partir da Tabela 11, onde está descrita a percentagem dos α e β-ácidos totais com os respectivos valores descritos no rótulo de cada variedade.

Tabela 10 - Quantificação dos α e β-ácidos (Cohumulona, n+adhumulona, colupulona e n+adlupulona) de 3 variedades de lúpulo comercial dado em % (g/100g de lúpulo seco).

| Variedades | α-ácidos | | β-ácidos | |
|-------------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Cohumulona % | n+adhumulona % | Colupulona % | n+adlupulona % |
| H, Magnum | 2,40 | 7,52 | 2,87 | 4,16 |
| Citra | 1,7 | 6,0 | 1,1 | 1,5 |
| Czech Premiant | 0,78 | 3,26 | 1,56 | 2,62 |

Tabela 11 - Porcentagem de α e β-ácidos de três variedades de lúpulo comercial

| Variedade de lúpulo comerciais | α-ácidos obtidos (%) | α-ácidos rótulo (%) | β-ácidos obtido (%) | β-ácidos rótulo (%) |
|---------------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Hallertauer Magnum | 9,92 | 12,60 | 7,03 | 5,0 – 7,0 |
| Citra | 7,69 | 13,00 | 2,62 | 3,5 – 4,5 |
| Czech Premiant | 4,04 | 8,10 | 4,18 | 3,5 - 6 |

Com os resultados obtidos, apenas os β -ácidos das variedades hallertauer magnum e czech premium corresponderam aos valores dos rótulos. Como foi citado anteriormente, vários fatores podem ter contribuído para a baixa concentração desses compostos, como o armazenamento e método de extração. Além disso, Taniguchi et al. (2013) cita que os α e β -ácidos são bem instáveis e oxidam facilmente, o que pode contribuir para diminuição das suas concentrações e até mesmo formação de novas substâncias.

Dessa forma, não foi possível descrever o teor de amargor nas variedades analisadas, sendo necessária a repetição de todas as análises e verificação de possíveis causas que podem ter contribuído para a baixa concentração dos ácidos amargos no lúpulo brasileiro e das variedades comerciais.

5.3 FITOTOXICIDADE

Nos ensaios macroscópicos, foram avaliados a porcentagem de germinação (%G), crescimento radicular (CR), crescimento aéreo (CA) e o índice de velocidade de germinação (IVG). Os extratos etanólicos foram preparados usando a flor fêmea de amostras de diferentes variedades de lúpulos e foram nomeados de: E1 (cascade em *pellets*), E2 (Hallertauer Mittelfrüh), E3 (Mantiqueira), E4 (Victoria), E5 (Canastra), E6 (Saaz colhida em dezembro de 2017), E7 (Saaz colhida em fevereiro de 2018), E8 (Cascade colhida em dezembro de 2017), E9 (Columbus), E10 (Brazylisk) e E11 (Bullion).

Os extratos de cada lúpulo foram testados nas mesmas concentrações frente à germinação e crescimento radicular de alface (eudicotiledônea) e sorgo (monocotiledônea). Nenhum deles foi tóxico para as sementes de sorgo, sendo que os valores de %G, CR, CA e IVG não diferiram estatisticamente dos controles. Os extratos E2 (extrato etanólico de Hallertauer Mittelfrüh), E4 (extrato etanólico de Victoria) e E8 (extrato etanólico de Cascade colhida em dezembro de 2017) não apresentaram toxicidade para as duas espécies usadas nos ensaios.

As concentrações usadas nos bioensaios foram baixas em se tratando de extratos botânicos ($<1,9 \text{ mg.mL}^{-1}$), que podem ser constituídas de uma mistura de compostos químicos, mesmo assim para os extratos E1, E3, E5, E6, E7, E9, E10 e

E11 foram observados efeitos fitotóxicos nos bioensaios utilizando a alface como planta modelo. Somente os resultados relevantes encontrados nos ensaios fitotoxicidade foram discutidos abaixo.

Devido às diferenças no rendimento de extrato obtido para cada variedade de lúpulo (mg de extrato por g de flor de lúpulo) e pela possível diferença na composição química de cada extrato, os ensaios foram realizados isoladamente para cada material. Não foi possível comparar o efeito fitotóxico entre as variedades e sim averiguar o potencial bioherbida de cada lúpulo.

Os dados de fitotoxicidade do E1 (extrato etanólico de cascade em *pellets*) foram apresentados na Tabela 12, usando as concentrações do referido extrato em 1,85 e 0,93 mg.mL⁻¹ a %G ocorreu inibição do crescimento, com valores abaixo dos controles. O CA usando E1 (extrato etanólico do cascade em *pellets*) a 1,85 mg.mL⁻¹ apresentou valor similar ao controle positivo (herbicida), já o extrato a 0,93 mg.mL⁻¹ apresentou valor similar ao controle negativo da água e ao herbicida. O IVG em ambos os extratos teve um menor valor com relação aos controles, mostrando que a velocidade de germinação foi mais lenta no ensaio usando o herbicida, O CR nestes extratos não diferiu dos valores dos controles. Diante disso, o E1 a 1,85 mg.mL⁻¹ apresentou toxicidade em sementes de alface, proporcionando abaixamento do percentual de germinação, diminuição do crescimento aéreo e no índice de velocidade de germinação em relação aos controles.

Tabela 12 - Fitotoxicidade do extrato etanólico de cascade em *pellets* (E1), em diferentes concentrações (mg.mL⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*

| E1 (mg.mL ⁻¹) | %G | CR (cm) | CA (cm) | IVG |
|---------------------------|----------|---------|---------|----------|
| 1,85 | 69,6 | 5,9 abc | 2,3 c | 5,2 |
| 0,93 | 85,6 | 7,9 ab | 3,1 a c | 7,6 |
| 0,46 | 90,4 abc | 9,7 ab | 6,6 ab | 10,4 abc |
| 0,23 | 98,4 abc | 9,1 ab | 6,1 abc | 11,5 abc |
| água (-) | 99,2 a | 7,7 a | 5,9 a | 11,8 a |
| DCM (-) | 96 b | 8,4 b | 7,2 b | 11,8 b |
| Glifosato (+) | 97,6 c | 4,7 c | 3,0 c | 11,9 c |

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett (P>0,05) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde: %G representa porcentagem de germinação, CR representa o crescimento radicular, CA representa o crescimento aéreo e IVG representa o índice de velocidade de germinação.

Em relação à fitotoxicidade apresentada pelo E3 (extrato etanólico Mantiqueira), apenas os valores de IVG divergiram dos controles usando as concentrações de 0,90 e 0,45 mg.mL⁻¹, apresentando valores mais baixos que o do herbicida testado (Tabela 13), Os outros parâmetros foram similares aos observados para os controles negativos, indicando que não houve fitotoxicidade relevante para o E3 nas concentrações utilizadas nos bioensaios.

Tabela 13 - Fitotoxicidade do extrato etanólico E3 (Mantiqueira), em diferentes concentrações (mg.mL⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

| E3 (mg.mL ⁻¹) | %G | CR | CA | IVG |
|---------------------------|----------|---------|---------|----------|
| 0,90 | 88,8 bc | 8,2 ab | 4,8 abc | 8,48 |
| 0,45 | 89,6 abc | 10,5 ab | 4,7 abc | 9,8 |
| 0,22 | 97,6 abc | 8,8 ab | 6,7 ab | 11,6 abc |
| 0,11 | 99,2 abc | 9,0 ab | 8 ab | 11,7 abc |
| água (-) | 99,2 a | 7,7 a | 5,9 a | 11,8 a |
| DCM (-) | 96 b | 8,4 b | 7,2 b | 11,8 b |
| Glifosato (+) | 97,6 c | 4,7 c | 3,0 c | 11,9 c |

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett ($P > 0,05$) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde: %G representa porcentagem de germinação, CR representa o crescimento radicular, CA representa o crescimento aéreo e IVG representa o índice de velocidade de germinação.

Os resultados de fitotoxicidade encontrados para o E5 (extrato etanólico de Canastra) foram apresentados na Tabela 14, os valores de CR foram maiores que para os controles em todas as concentrações utilizadas, houve um efeito indutor. Somente usando as maiores concentrações de E5 (0,90 mg.mL⁻¹ e a 0,45 mg.mL⁻¹) foi observado um IVG mais baixo que do herbicida. Dessa forma, o extrato E5 pode ter efeito antagônico ao herbicida, pois apresentou efeito estimulante ao desenvolvimento e crescimento radicular de alface.

Tabela 14 - Fitotoxicidade do extrato etanólico E5 (Canastra) em diferentes concentrações (mg.mL⁻¹) frente o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

| E5 (mg.mL ⁻¹) | %G | CR | CA | IVG |
|---------------------------|----------|-------|---------|----------|
| 0,90 | 90,4 abc | 11,7 | 3,9 abc | 8,9 |
| 0,45 | 93,6 abc | 13,3 | 7,9 ab | 8,9 |
| 0,22 | 99,2 abc | 13,2 | 10,5 b | 10,5 abc |
| 0,11 | 96,8 abc | 11,5 | 9,1 ab | 10,8 abc |
| água (-) | 99,2 a | 7,7 a | 5,9 a | 11,8 a |
| DCM (-) | 96 b | 8,4 b | 7,2 b | 11,8 b |
| Glifosato (+) | 97,6 c | 4,7 c | 3,0 c | 11,9 c |

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett ($P>0,05$) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde: %G representa porcentagem de germinação, CR representa o crescimento radicular, CA representa o crescimento aéreo e IVG representa o índice de velocidade de germinação.

O E6 (extrato etanólico do Saaz colhida em dezembro de 2017) teve efeito indutor, maiores valores de CR foram encontrados em relação os controles, exceto usando a concentração de $0,32 \text{ mg.mL}^{-1}$. O CA na concentração $0,16 \text{ mg.mL}^{-1}$ diferiu dos valores dos controles, mas apresentou valor mais alto que os controles negativos. Somente usando a concentração de $0,65 \text{ mg.mL}^{-1}$ foi observado o IVG foi mais baixo que do herbicida (Tabela 15).

Tabela 15 - Fitotoxicidade do extrato etanólico E6 (Saaz colhida em dezembro de 2017), em diferentes concentrações (mg.mL^{-1}), frente o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

| E6 (mg.mL^{-1}) | %G | CR | CA | IVG |
|----------------------------|----------|---------|---------|----------|
| 0,65 | 93,6 abc | 11,4 | 6,1 abc | 9,8 |
| 0,32 | 95,2 abc | 10,4 ab | 7,7 ab | 10,3 abc |
| 0,16 | 98,4 abc | 13,5 | 10,7 | 10,9 abc |
| 0,08 | 94,4 abc | 11,4 | 10,1 b | 10,4 abc |
| água (-) | 99,2 a | 7,7 a | 5,9 a | 11,8 a |
| DCM (-) | 96 b | 8,4 b | 7,2 b | 11,8 b |
| Glifosato (+) | 97,6 c | 4,7 c | 3,0 c | 11,9 c |

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett ($P>0,05$) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde: %G representa porcentagem de germinação, CR representa o crescimento radicular, CA representa o crescimento aéreo e IVG representa o índice de velocidade de germinação.

De modo similar aos resultados para a mesma variedade, usando o E7 (extrato etanólico de Saaz colhida em fevereiro de 2018) usando as concentrações $0,29 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $0,14 \text{ mg.mL}^{-1}$ foi observado maior valor de CR em relação aos controles, porém apenas o extrato de concentração $0,59 \text{ mg.mL}^{-1}$ que apresentou IVG abaixo do herbicida (Tabela 16).

Tabela 16 - Fitotoxicidade do extrato etanólico E7 (Saaz colhida em fevereiro de 2018), em diferentes concentrações (mg.mL⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

| E7 (mg.mL⁻¹) | %G | | CR | | CA | | IVG | |
|--------------------------------|-----------|-----|-----------|----|-----------|---|------------|-----|
| 0,59 | 96 | abc | 10,7 | ab | 9,8 | b | 9,9 | |
| 0,29 | 96,8 | abc | 11,9 | | 9,9 | b | 11 | abc |
| 0,14 | 96,8 | abc | 12,2 | | 10,2 | b | 11,2 | abc |
| 0,07 | 98,4 | abc | 11,2 | b | 9,5 | b | 10,7 | abc |
| água (-) | 99,2 | a | 7,7 | a | 5,9 | a | 11,8 | a |
| DCM (-) | 96 | b | 8,4 | b | 7,2 | b | 11,8 | b |
| Glifosato (+) | 97,6 | c | 4,7 | c | 3,0 | c | 11,9 | c |

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett (P>0,05) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde: %G representa porcentagem de germinação, CR representa o crescimento radicular, CA representa o crescimento aéreo e IVG representa o índice de velocidade de germinação.

Usando a maior concentração de E9 (extrato etanólico de Columbus) que foi de 1,18 mg.mL⁻¹ os valores de %G e o IVG foram abaixo dos controles e o CA se igualou estatisticamente ao herbicida em todas as concentrações testadas, e apenas o CR apresentou valor similar aos controles negativos. Dessa forma, para E9 foi observado efeito fitotóxico em alface nas concentrações testadas (Tabela 17).

Tabela 17 - Fitotoxicidade do extrato etanólico E9 (Columbus), em diferentes concentrações (mg.mL⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

| E9 (mg.mL⁻¹) | %G | | CR | | CA | | IVG | |
|--------------------------------|-----------|-----|-----------|----|-----------|-----|------------|-----|
| 1,18 | 83,2 | | 7,7 | ab | 1,6 | c | 6,4 | |
| 0,60 | 94,4 | abc | 8,6 | ab | 0,9 | c | 10,2 | abc |
| 0,30 | 96,8 | abc | 10,2 | ab | 1,9 | c | 11,7 | abc |
| 0,15 | 99,2 | abc | 8,9 | ab | 3,5 | a c | 11,9 | abc |
| água (-) | 99,2 | a | 7,7 | a | 5,9 | a | 11,8 | a |
| DCM (-) | 96 | b | 8,4 | b | 7,2 | b | 11,8 | b |
| Glifosato (+) | 97,6 | c | 4,7 | c | 3,0 | c | 11,9 | c |

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett (P>0,05) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde: %G representa porcentagem de germinação, CR representa o crescimento radicular, CA representa o crescimento aéreo e IVG representa o índice de velocidade de germinação.

Os resultados do ensaio de fitotoxicidade para E10 (extrato etanólico de Brazyliisk) foram apresentados na Tabela 18 e os dados apontam que houve indução do crescimento, usando as concentrações 0,40; 0,20 e 0,10 mg.mL⁻¹ os valores de CR foram valores mais altos que os encontrados para os controles negativos. O CA

em 0,40 mg.mL⁻¹ e 0,20 mg.mL⁻¹ foi comparado ao herbicida, que pode ser justificado pela energia gasta no CR para sair do ambiente tóxico, e com isso não consegue desenvolver no crescimento aéreo. Apenas o IVG em 0,80 mg.mL⁻¹ apresentou valor que diferiu dos controles, com baixa velocidade de germinação.

Tabela 18 - Fitotoxicidade do extrato etanólico de E10 (Brazylik), em diferentes concentrações (mg.mL⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

| E10 (mg.mL ⁻¹) | %G | CR | CA | IVG |
|----------------------------|----------|---------|---------|----------|
| 0,80 | 94,4 abc | 10,1 ab | 2,9 a c | 9,4 |
| 0,40 | 96,8 abc | 12,9 | 1,8 c | 10,8 abc |
| 0,20 | 99,2 abc | 12,9 | 2,4 c | 11,6 abc |
| 0,10 | 96,8 abc | 12,0 | 4,3 abc | 11,3 abc |
| água (-) | 99,2 a | 7,7 a | 5,9 a | 11,8 a |
| DCM (-) | 96 b | 8,4 b | 7,2 b | 11,8 b |
| Glifosato (+) | 97,6 c | 4,7 c | 3,0 c | 11,9 c |

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett ($P>0,05$) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde: %G representa porcentagem de germinação, CR representa o crescimento radicular, CA representa o crescimento aéreo e IVG representa o índice de velocidade de germinação.

O efeito indutor no crescimento da raiz de alface foi observado no ensaio fitotóxico utilizando o E11 (extrato etanólico de Bullion) usando as concentrações de 0,38; 0,19 e 0,09 mg.mL⁻¹, o CR encontrado foi maior que para os controles negativos (Tabela 19). No entanto, o CA em todas as concentrações usadas foram similares ao observado para o herbicida, mas apenas nas concentrações a 100% e 50% os valores de IVG diferiram de todos os controles, com valores mais baixos. Assim, ocorreu indução no crescimento radicular e inibição do crescimento aéreo, que pode ser justificado pelo ambiente tóxico em que se encontram, favorecendo assim o CR, e posteriormente um baixo CA. Diante disso, podemos dizer que nas concentrações mais altas houve efeito fitotóxico para as sementes, já que o IVG diferiu estatisticamente dos controles.

Tabela 19 - Fitotoxicidade extrato etanólico E11 (Bullion), em diferentes concentrações (mg.mL⁻¹), frente o desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa*.

| E11 (mg.mL ⁻¹) | %G | CR | CA | IVG |
|----------------------------|----------|--------|-------|----------|
| 0,77 | 89,6 abc | 10,8 b | 1,1 c | 6,6 |
| 0,38 | 98,4 abc | 12,3 | 1,8 c | 9,4 |
| 0,19 | 96,8 abc | 13,5 | 2,0 c | 11,0 abc |
| 0,09 | 98,4 abc | 12,8 | 1,9 c | 10,9 abc |
| água (-) | 99,2 a | 7,7 a | 5,9 a | 11,8 a |
| DCM (-) | 96 b | 8,4 b | 7,2 b | 11,8 b |
| Glifosato (+) | 97,6 c | 4,7 c | 3,0 c | 11,9 c |

*As médias seguidas pelas mesmas letras representam semelhança significativa, de acordo com o teste de Dunnett ($P>0,05$) e médias seguidas por letras diferentes representam diferença, de acordo com o teste. Onde: %G representa porcentagem de germinação, CR representa o crescimento radicular, CA representa o crescimento aéreo e IVG representa o índice de velocidade de germinação.

De todos os parâmetros macroscópicos medidos em testes de alelopatia (IVG), a % de germinação é considerada a menos sensível, enquanto o crescimento radicular (CR) e crescimento aéreo (CA) são considerados os critérios mais importantes para detectar toxicidade de compostos alelopáticos. Por sua vez, o IVG é diretamente afetado pelo atraso na germinação, e pode contribuir para reduções significativas no desenvolvimento das mudas (CARVALHO et al., 2019).

Schmalreck et al. (1975) relatou que algumas resinas do lúpulo são biologicamente ativas devido as suas cadeias laterais do grupo isoprenil. O caráter lipofílico das moléculas, junto com a baixa solubilidade em água, força as resinas na membrana lipofílica, induzindo o vazamento da membrana e morte celular. A perda das cadeias laterais isoprenil resulta na diminuição da atividade antimicrobiana. A introdução de carbonila, hidroxila ou peroxi também diminui a atividade biológica. Aumentando o nível hidrofílico, a solubilidade em água aumenta e diminui a capacidade das resinas de lúpulo permear e impede a concentração inibitória no alvo local, a membrana celular. A cada ligação de hidrogênio formado reduz a taxa de transferência para fase lipídio de 6 a 10 vezes. O poder amargor pode ser relacionado à potência antibiótica e solubilidade em água.

Por fim, os extratos que apresentaram os valores dos parâmetros similares ao herbicida e que diferiram dos controles foram os de maior concentração, sendo eles E1, E9 e E11. Contudo, alguns extratos apresentaram alguns dos parâmetros característicos de toxidade para sementes, enquanto outros parâmetros se

igualaram aos controles, sendo necessária uma análise citogenética para confirmação.

6. CONCLUSÃO

Uma metodologia rápida para a extração de voláteis de lúpulos foi desenvolvida por HS-SPME, em apenas 10 minutos, a 30 °C. Após as análises desses voláteis por GC-MS, foram encontradas diferenças nas constituições de voláteis do lúpulo cascade em *pellets* importada em relação a todas as amostras cultivadas no Brasil, assim como foi determinada uma composição distinta dos voláteis de duas amostras de lúpulo em flor cascade cultivadas no Brasil, colhido em diferentes épocas do ano (inverno e verão).

Os principais constituintes encontrados nos óleos essenciais de lúpulo: β -mirceno, α -humuleno, trans-cariofileno e o β -farneseno foram encontrados em quase todas as amostras analisadas. Sendo que, o β -mirceno foi o constituinte majoritário em todas as amostras de lúpulos cultivadas no Brasil.

Os α e β ácidos de amostras de lúpulo brasileiro foram quantificados por análises em HPLC e de 4 amostras comerciais, os teores foram abaixo dos valores relatados na literatura. Vários fatores podem ter contribuído para isso, como tempo de armazenamento, esses compostos são oxidados com facilidade e ainda, a forma que foi realizada a extração pode influenciar nos resultados. Dessa forma, novos experimentos deverão ser realizados para que a metodologia seja ajustada.

Tendo em vista o efeito fitotóxico encontrado para os extratos etanólicos E1 (cascade em *pellets*), E9 (Columbus) e E11 (Bullion) em alface, estudar e isolar os constituintes químicos desses lúpulos para novos ensaios de fitotoxicidade tornará possível a abertura de um campo de estudo de novos possíveis bioherbicidas.

7. REFERÊNCIAS

ABRAM, V.; CEH, B.; VIDMAR, M.; HERCEZI, M.; LAZIC, N.; BUCIK, V.; MOZINA, S. S.; KOSIR, I. J.; KAC, M.; DEMSAR, L.; ULRIH, N. P. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. **Industrial crops and products**. V. 64, p. 124-134, 2015.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry**, London: Allured Pub, Corp., 2007, 804p.

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.

ALMAGUER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. Comparative study of the contribution of hop (*Humulus lupulus* L.) hard resins extracted from different hop varieties to beer quality parameters. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. V. 73, n. 2, p. 115-123, 2015.

ALVES, T.A.; PINHEIRO, P.F.; PRAÇA-FONTES, M.M.; FONSECA, L.A.V.; CORRÊA, K.B.; ALVES, T.A.; DA CRUZ, F.A.; LACERDA JÚNIOR, V.; FERREIRA, A.; SOARES, T.C.B. Toxicity of thymol, carvacrol and their respective phenoxyacetic acids in *Lactuca sativa* and *Sorghum bicolor*. **Industrial Crops and Products**. v. 114, p. 59-67, 2018.

ARAGÃO, F.B.; QUEIROZ, V. T.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; PINHEIRO, P. F.; CARRIJO, T. T.; & ANDRADE-VIEIRA, L. F. Phytotoxicity and cytotoxicity of *Lepidaploa rufogrisea* (Asteraceae) extracts in the plant model *Lactuca sativa* (Asteraceae). **Revista de Biología Tropical**. v. 65, n. 2, p. 435-443, 2017.

ARAGÃO, F. B.; PALMIERI, M. J.; FERREIRA, A.; COSTA, A. V.; QUEIROZ, V. T.; PINHEIRO, P. F.; & ANDRADE-VIEIRA, L. F. Phytotoxic and cytotoxic effects of *Eucalyptus* essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**. v. 35, n. 2, p. 259-272, 2015.

ARAÚJO, L. V.; SOLANA, R. R.; DIÉGUEZ, S. M. C.; DOMÍNGUEZ, J. M. Use of hydrodistillation and headspace solid-phase microextraction to characterize the volatile composition of different hop cultivars. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 93, n. 10, p. 2568-2574, 2013.

BAKER, G. A.; DANENHOWER, T. M.; FORCE, L. J.; PETERSEN, K. J.; BETTS, T. A. HPLC Analysis of α - and β -Acids in Hops. **Journal of Chemical Education**. v. 85, n. 7, p. 954, 2008.

BAMFORTH, C. (Ed.). **Brewing materials and processes: A practical approach to beer excellence**. Academic Press. 2016.

BASSANETTI, I.; CARCELLI, M.; BUSCHINI, A.; MONTALBANO, S.; LEONARDI, G.; PELAGATTI, P.; TOSI, G.; MASSI, P.; FIORENTINI, L.; ROGOLINO, D.

Investigation of antibacterial activity of new classes of essential oils derivatives. **Food Control**. v. 73, p. 606-612, 2017.

BRASIL, **Decreto n. 2.314, de 04 de setembro de 1997**. Regulamenta a Lei n. 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.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, **Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm>. Acesso em 04 abr. 2018.

CERVBRASIL, **Anuário 2016**. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/anuario2016/161130_CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf>. Acesso em: 04 abr. 2018.

CLEEMPUT, V. M.; CATTOOR, K.; BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; KEUKELEIRE, D.; HEYERICK, A. Hop (*Humulus lupulus*) – derived bitter acids as multipotent bioactive compounds. **Journal of natural products**. v. 72, n. 6, p. 1220-1230, 2009.

CRUZ, C. D. Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum, Agronomy**. v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.

DEKEUKELEIRE, J.; OOMS, G.; HEYERICK, A.; ROLDAN-RUIZ, I.; VAN BOCKSTAELE, E.; DE KEUKELEIRE, D. Formation and accumulation of α -acids, β -acids, desmethylxanthohumol, and xanthohumol during flowering of hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 51, n. 15, p. 4436-4441, 2003.

Departamento de Agricultura dos Estados Unidos. Disponível em: <<https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/2450/hopcultivars/56001.html>> Acesso em: 20 de junho de 2018.

FARAG, M. A.; PORZEL, A.; SCHMIDT, J.; WESSEJOHANN, L. A. Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): a comparison of MS and NMR methods in metabolomics. **Metabolomics**. v. 8, n. 3, p. 492-507, 2012.

FARAGÓ, J.; PŠENÁKOVÁ, I.; FARAGOVÁ, N. The use of biotechnology in hop (*Humulus lupulus* L.) improvement. **Nova Biotechnol**. v. 9, p. 279-293, 2009.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Quím, Nova esc**. São Paulo. v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FILHO, V.; GASTONI, W. Bebidas alcoólicas: Ciência e Tecnologia. 2 ed. São Paulo: Editora Blucher. 2016, v.1, 576 p.

GAOFENG, X. U.; SHICAI, S. H. E. N.; FUDOU, Z. H. A. N. G.; YUN, Z. H. A. N. G.; HISASHI, K. N.; & DAVID, R. C. Relationship Between Allelopathic Effects and Functional Traits of Different Allelopathic Potential Rice Accessions at Different Growth Stages. **Rice Science**. v. 25, n. 1, p. 32-41, 2018.

GONÇALVES, J. L.; FIGUEIRA, J. A.; RODRIGUES, F. P.; ORNELAS, L. P.; BRANCO, R. N.; SILVA, C. L.; CAMARA, J. S. A powerful methodological approach combining headspace solid phase microextraction, mass spectrometry and multivariate analysis for profiling the volatile metabolomic pattern of beer starting raw materials. **Food chemistry**. v. 160, p. 266-280, 2014.

GreatLakes Hops. Disponível em: <<https://www.greatlakeshops.com/>> acesso em: 20 de junho de 2018.

HAAS, J. I. Guia de Lúpulo Barth-Haas. 2. ed, EUA: Barth-Haas Grup, 2013.

HVG. Hop Varieties. Disponível em: <<http://www.hvg-germany.de/en/hop-production/hop-varieties/characteristics>> Acesso em: 02 de fevereiro de 2018.

JÚNIOR, O. C.; JUNIOR, J. R. T.; GALINARI, R.; RAWET, E. L.; SILVEIRA, C. T. J. O setor de bebidas no Brasil. BNDES Setorial 40. p. 93-130. Disponível em:<https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/3462/1/BS%2040%20O%20setor%20de%20bebidas%20no%20Brasil_P.pdf> acesso em: 10 de abr. de 2018.

KARABIN, M.; HUDCOVA, T.; JELINEK, L.; DOSTALEK, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotechnology advances**. v. 33, n. 6, p. 1063-1090, 2015.

KASKONAS, P.; STANIUS, Z.; KASKONIEN, V.; OBELEVICIUS, K.; RAGAZINSKIENE, O.; ZILINSKAS, A.; MARUSKA, A. Clustering analysis of different hop varieties according to their essential oil composition measured by GC/MS. **Chemical Papers**. v. 70, n. 12, p. 1568-1577, 2016.

KEUKELEIRE, D. D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**. v. 23, n.1, p.108-112, 2000.

KHALID, A. K.; EL-GOHARY, A. E. Effect of seasonal variations on essential oil production and composition of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) grow in Egypt. **International Food Research Journal**. v. 21, n. 5, p. 1859, 2014.

KIRIN BEER UNIVERSITY REPORT. Global beer consumption by country in 2013, 2014. Disponível em: <http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2014/1224_01.html> Acesso em: 04 de abr. de 2018.

KRAMER, B.; THIELMANN, J.; HICKISCH, A.; MURANYI, P.; WUNDERLICH J.; HAUSER, C. Antimicrobial activity of hop extracts against food born pathogens for meat applications. **Journal of applied microbiology**. v. 118, n. 3, p. 648-657, 2015.

KROFTA, K.; MIKYŠKA, A. Beta kyseliny chmele, význam a využití Hop beta acids: Properties, Significance and Utilization. Kvasny Prum, 2014.

KROFTA, K.; NESVADBA, V. UTILISATION OF SOLID-PHASE MICROEXTRACTION IN HOP OIL ANALYSES. In: **I International Humulus Symposium 668**. 2004, p. 191-200.

LEITE, I. R.; FARIA, J. R.; MARQUEZ, L. D. S.; REIS, M. H. M.; RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J.; CARDOSO, V. L. Evaluation of hop extract as a natural antibacterial agent in contaminated fuel ethanol fermentations. **Fuel processing technology**. v. 106, p. 611-618, 2013.

LOPES, W. L.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; CARVALHO, M. F. B.; BEZZERA, M. A. Application of multivariate techniques in the optimization of a procedure for the determination of bioavailable concentrations of selenium and arsenic in estuarine sediments by ICP OES using a concomitant metals analyzer as a hydride generator. *Talanta*, 79 (2009) 1276 – 1282.

MATSUI, H.; INUI, T.; OKA, K.; FUKUI, N. A influência da poda e da época de colheita no aroma do lúpulo, na aparência do cone e no rendimento. **Química dos Alimentos**. v. 202, p. 15 a 22 de 2016.

MARCUSO, E. F.; MULLER, C. V. A Cerveja no Brasil: O ministério da agricultura informando e esclarecendo, 2018. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/producao-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf>> Acesso em: 15 de jan. 2019.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. In: **Embrapa Meio Ambiente-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. Horticultura Brasileira. Brasília, DF, v. 27, n. 2, p. S3299-S3302. ago. 2009. CD-ROM. Suplemento, Trabalho apresentado no 49, Congresso Brasileiro de Olericultura, Águas de Lindóia, SP., 2009.

MOZNY, M.; TOLASZ, R.; NEKOVAR, J.; SPARKS, T.; TRNKA, M.; ZALUD, Z. The impact of climate change on the yield and quality of Saaz hops in the Czech Republic. **Agricultural and Forest Meteorology**. v. 149, n. 6-7, p. 913-919, 2009.

NOVA SCOTIA Hop Growers' Guide. 2013.

OCVIRK, M.; GRDADOLNIK, J.; KOŠIR, I. J. Determination of the botanical origin of hops (*Humulus lupulus* L.) using different analytical techniques in combination with statistical methods. *J. Inst. Brew.* n. 122, p. 452–461, 2016.

OLSOVSKA, J.; BOSTIKOVA, V.; DUSEK, M.; JANDOVSKA, V.; BOGDANOVA, K.; CERMAK, P.; BOSTIK, P.; MIKYŠKA, A.; KOLAR, M. *Humulus lupulus* L. (Hops) - a valuable source of compounds with bioactive effects for future therapies. *Mil. Med. Sci. Lett. (Voj. Zdrav. Listy)*, v. 85, n. 1, p. 19-30, 2016.

PISTELLI, L.; FERRI, B.; CIONI, P. L.; KOZIARA, M.; AGACKA, M.; & SKOMRA, U. Aroma profile and bitter acid characterization of hop cones (*Humulus lupulus* L.) of five healthy and infected Polish cultivars. **Industrial Crops and Products**. v. 124, p. 653-662. 2018.

PRAGST, F. Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 388, n. 7, p. 1394-414. 2007.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A química da cerveja. **Quím. Nova esc.** São Paulo. v. 37, n. 2, p. 98-105, 2015.

PINHEIRO, P. F.; COSTA, A. V.; ALVES, T. D. A.; GALTER, I. N.; PINHEIRO, C. A.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. M. R.; FONTES, M. M. P. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol and thymol in plant bioassays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 63, n. 41, p. 8981-8990, 2015.

PUDEŁKO, K.; MAJCHRZAK, L.; NAROŻNA, D. Allelopathic effect of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.) on monocot and dicot plant species. **Industrial Crops and Products**. v. 56, p. 191-199, 2014.

RETTBERG, N.; BIENDL, M.; GARBE, L. Hop Aroma and Hoppy Beer Flavor: Chemical Backgrounds and Analytical Tools - A Review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. v. 76, n. 1, p. 1-20, 2018.

SANTOS, J. I. C.; DINHAM, R. O essencial em cerveja e destilados. São Paulo: Editora Senac. São Paulo, 2006, 135p.

SARNIGHAUSEN, P.; SARNIGHAUSEN, V. C. R.; DAL PAI, A. **O Lúpulo e a oportunidade do Agronegócio no Brasil**. 6ª Jornada de Iniciação Científica da FATEC de Botucatu, 23 a 27 de outubro de 2017, Botucatu, São Paulo, Brasil.

SCHMALRECK, A. F.; TEUBER, M.; REININGER, W.; HARTL, A. Structural features determining the antibiotic potencies of natural and synthetic hop bitter resins, their precursors and derivatives. **Canadian journal of microbiology**. v. 21, n. 2, p. 205-212, 1975.

SIRRINE, J. R.; ROTHWELL, N.; LIZOTTE, E.; GOLDY, R.; MARQUIE, S.; & BROWN-RYTLEWSKI, D. E. Sustainable Hop Production in the Great Lakes Region. **Michigan State University Extension Bulletin E-3083**. Publisher: Michigan State University Extension, 2010.

SKOOG, W. H. C. Fundamentos de Química Analítica. 8. ed, São Paulo: Thomson Learning, 2010.

SMALL, E. A numerical and nomenclatural analysis of morphogeographic taxa of *Humulus*. *System. Bot.* 3. 37-76, 1978.

STEVENS, R. The chemistry of hop constituents. **Chemical Reviews**. v. 67, n. 1, p. 19-71, 1967.

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.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**. v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

Variety Manual Hop Growers of América. **Hop Growers of America**. Disponível em: <<https://www.usahops.org/>> acesso em: 20 de junho de 2018.

VAUGHAN, A.; O'SULLIVAN, T.; VAN SINDEREN, D. Enhancing the Microbiological Stability of Malt and Beer – A Review. **Journal of the Institute of Brewing**. v. 111, n. 4, p. 355-371, 2005.

ZANOLI, P.; ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 116, n. 3, p. 383-396, 2008.

ANEXOS

Anexo A – Cromatogramas obtidos no HPLC do Padrão ICE-3

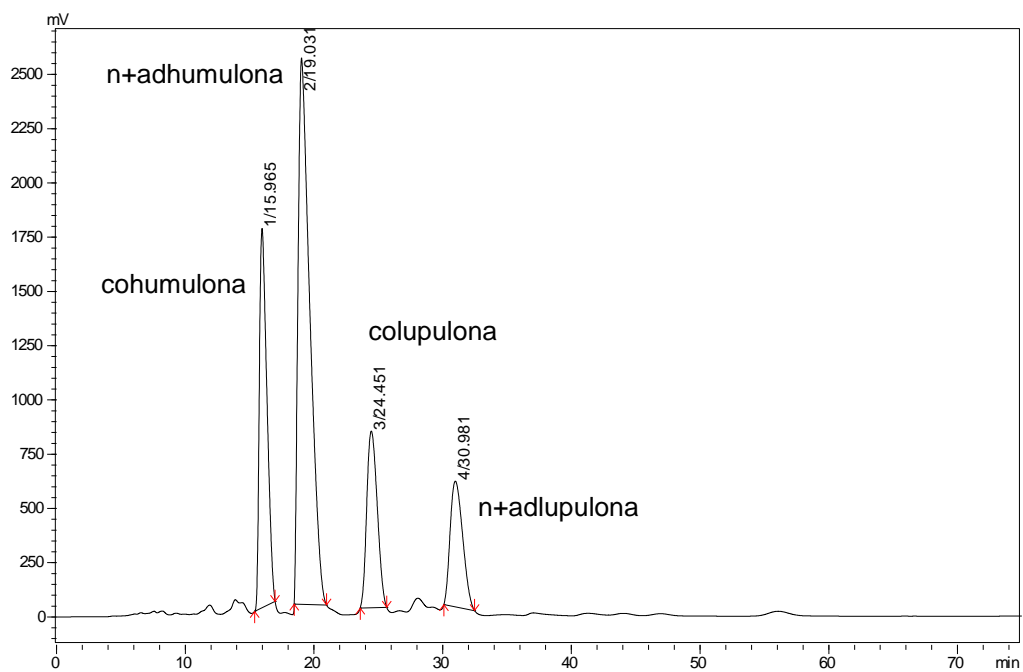


Figura A1 - Cromatograma obtido no HPLC do padrão ICE-3 na concentração de 6 mg.mL⁻¹.

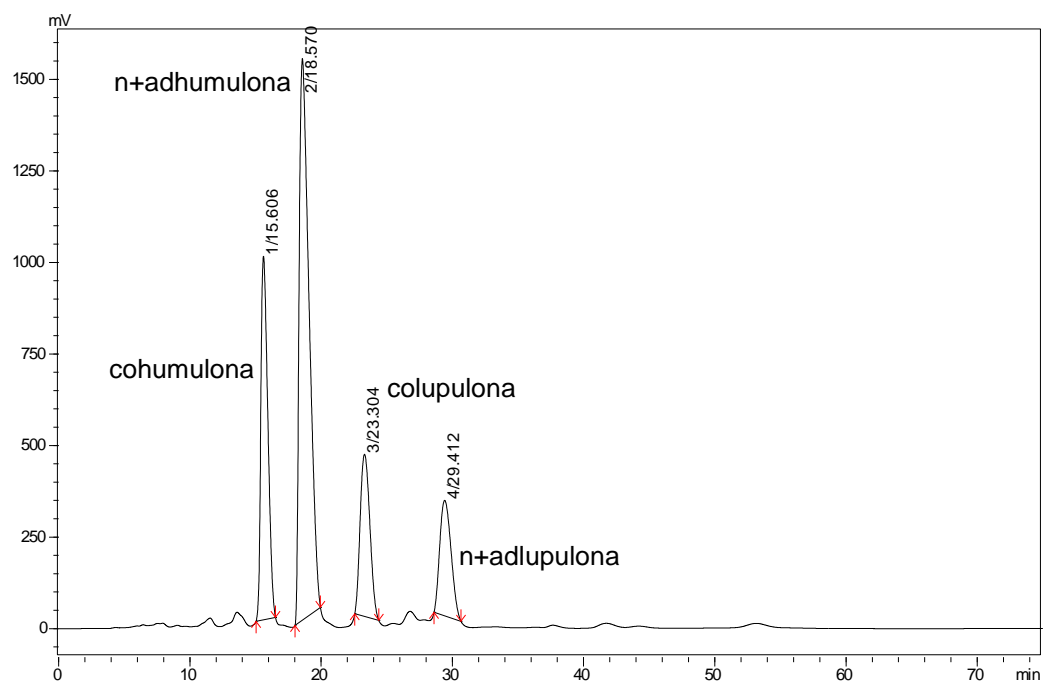


Figura A2 - Cromatograma obtido no HPLC do padrão ICE-3 na concentração de 3 mg.mL⁻¹.

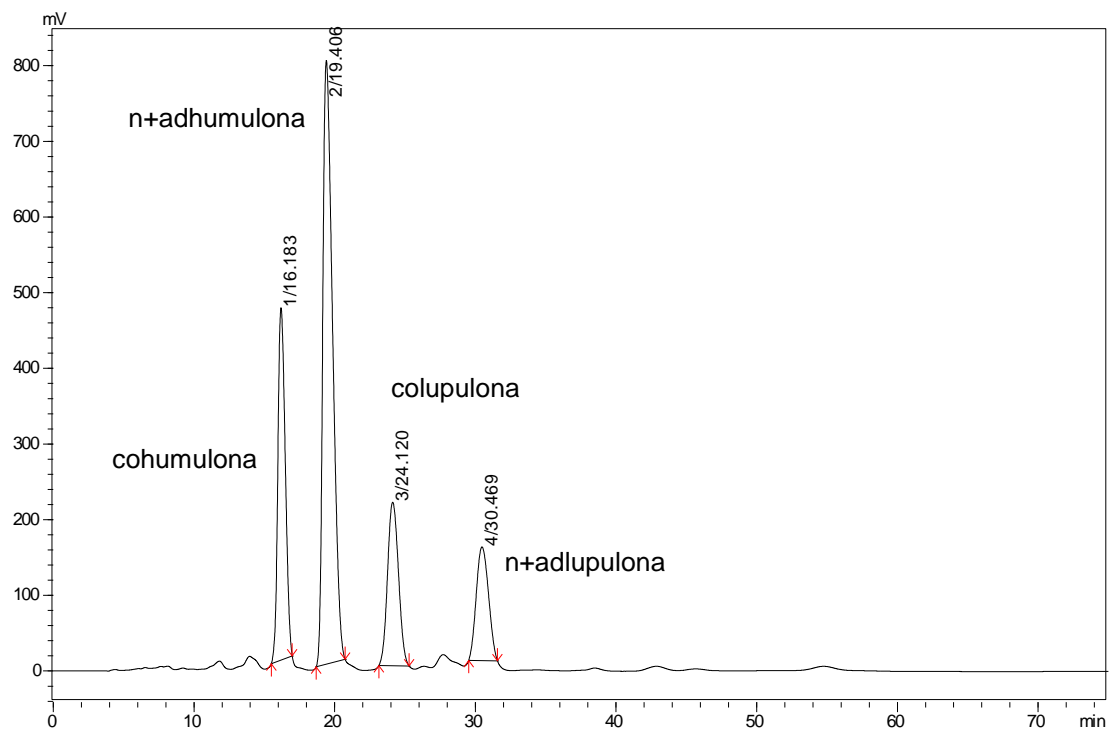


Figura A3 - Cromatograma obtido no HPLC do padrão ICE-3 na concentração de 1,5 mg.mL⁻¹.

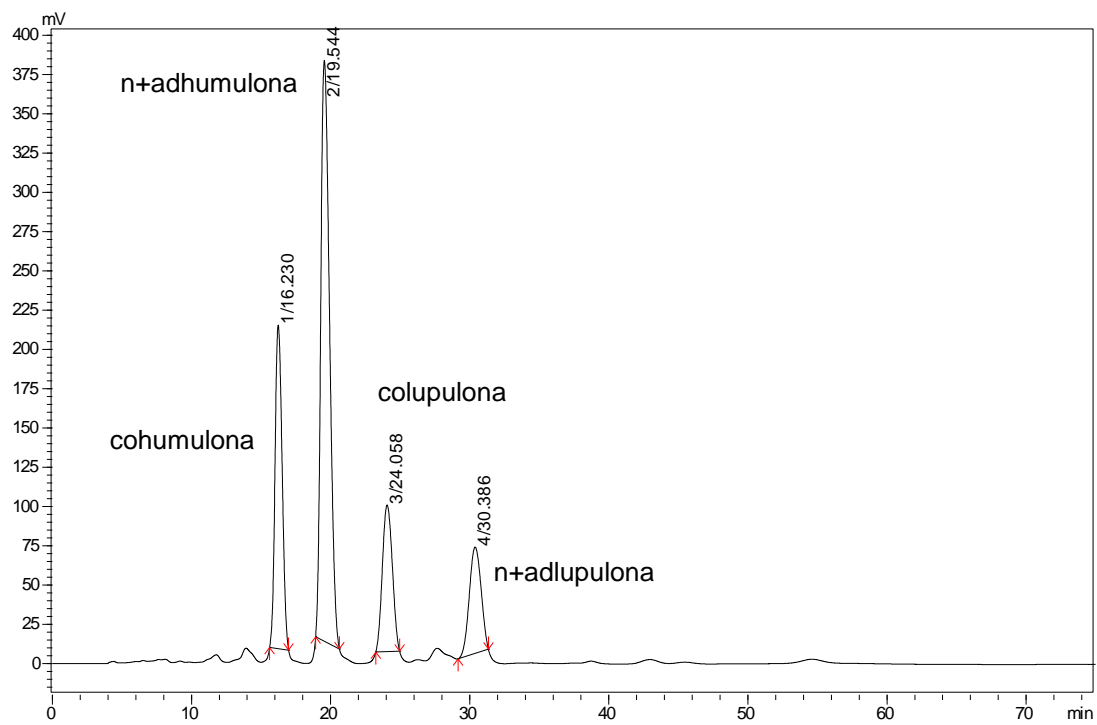


Figura A4 - Cromatograma obtido no HPLC do padrão ICE-3 na concentração de 0,75 mg.mL⁻¹.

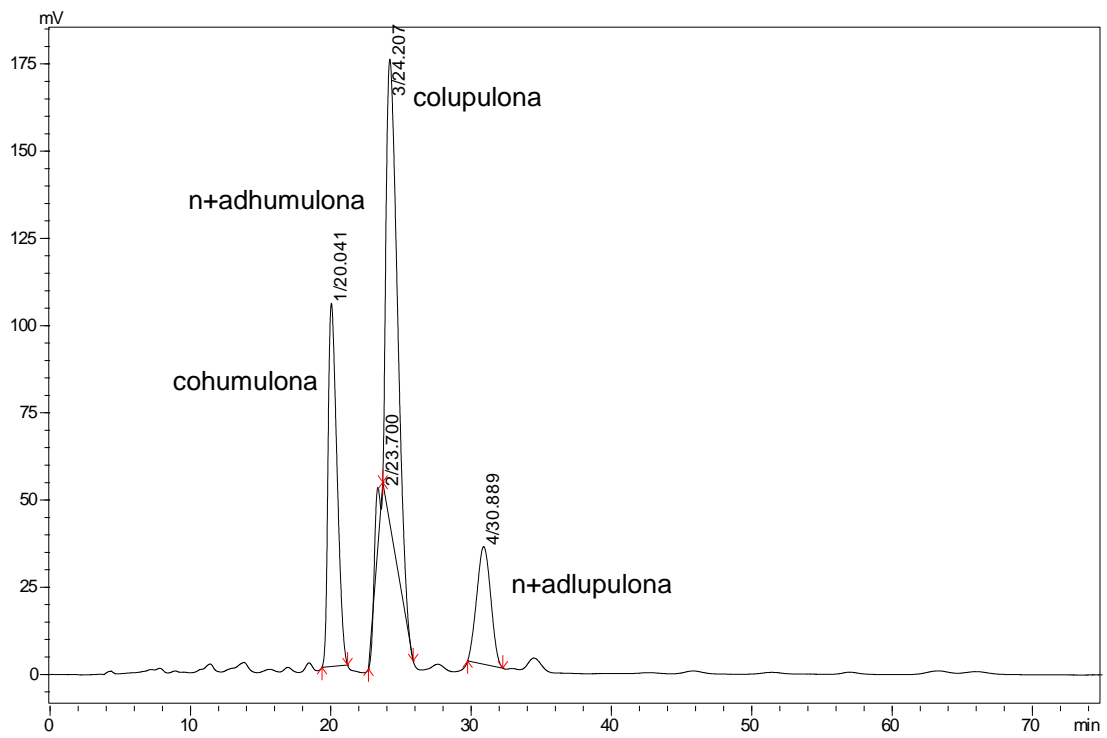


Figura A5 - Cromatograma obtido no HPLC do padrão ICE-3 na concentração de $0,325 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

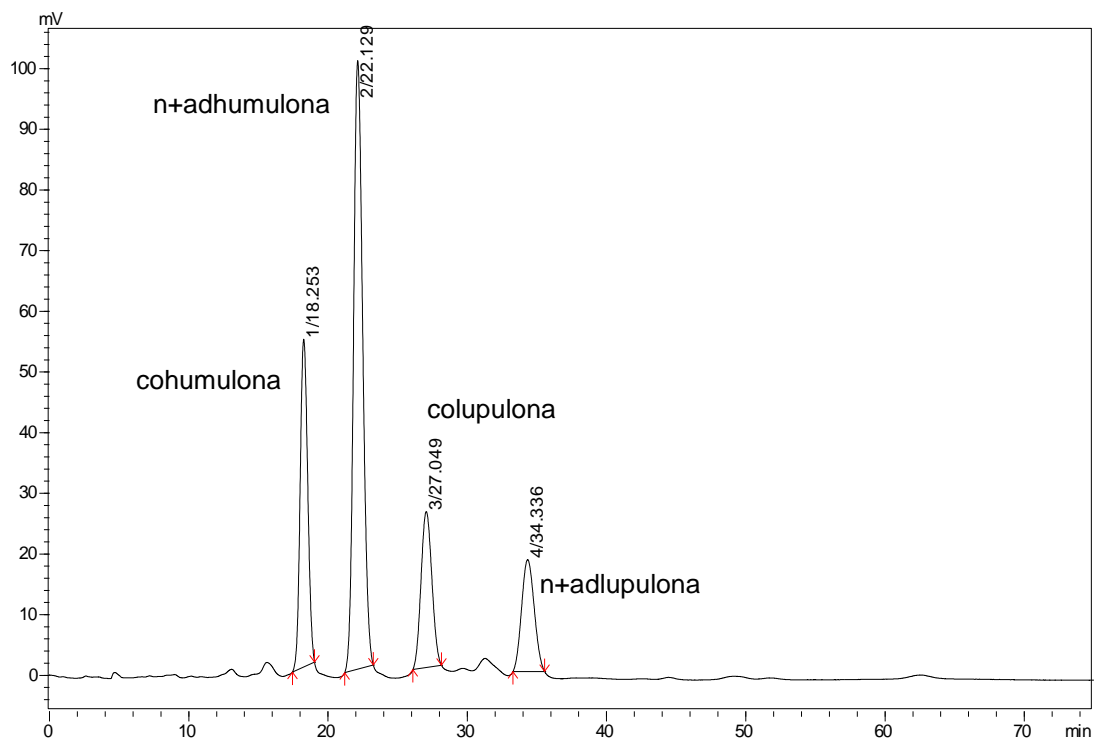


Figura A6 - Cromatograma obtido no HPLC do padrão ICE-3 na concentração de $0,187 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Anexo B – Cromatogramas obtidos no HPLC – α E β Ácidos de lúpulo brasileiro

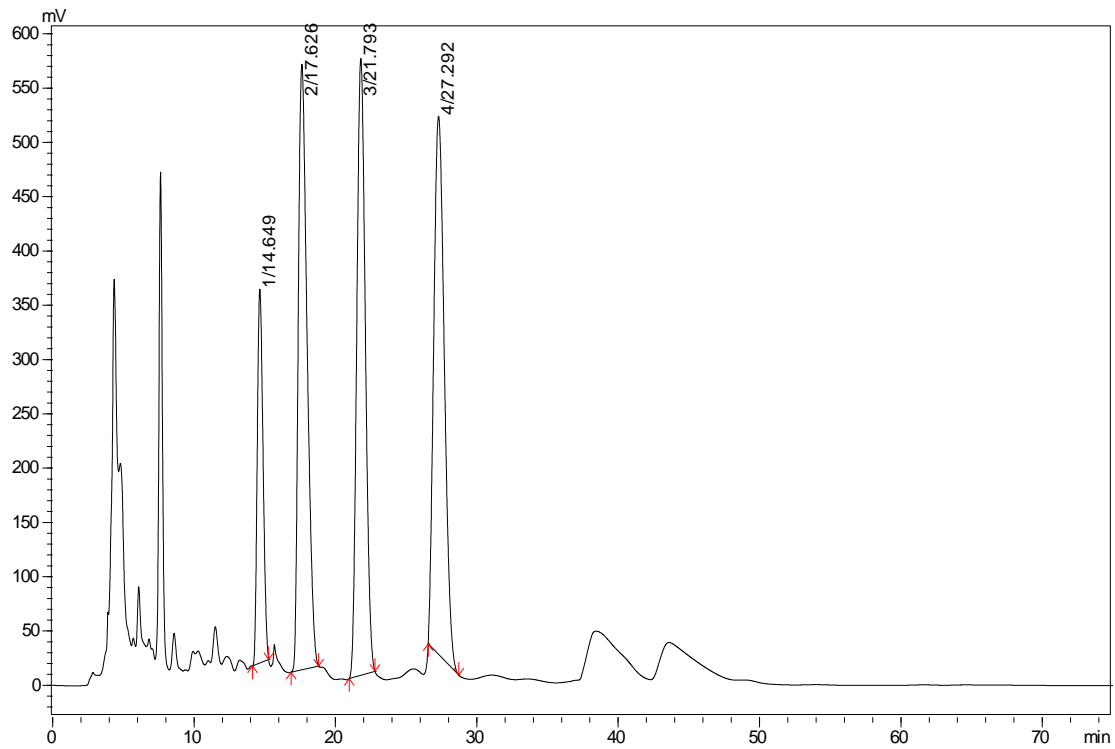


Figura B1 – Cromatograma obtido no HPLC da variedade Cascade em *pellets*.

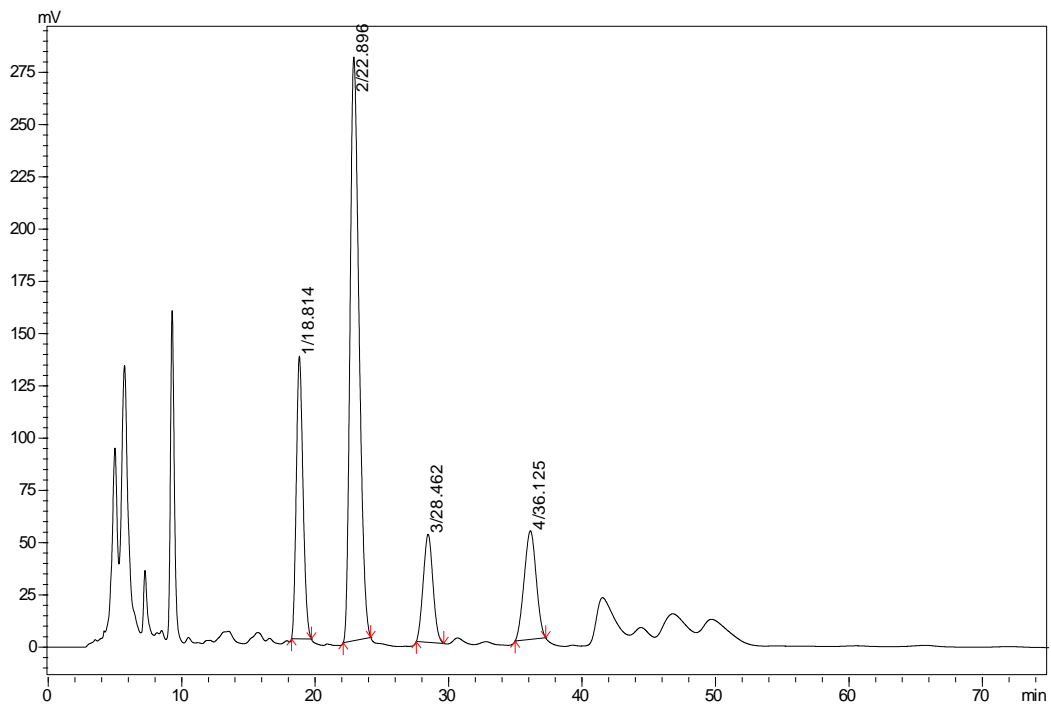


Figura B2 – Cromatograma obtido no HPLC da variedade Hallertauer Mittelfrüh.

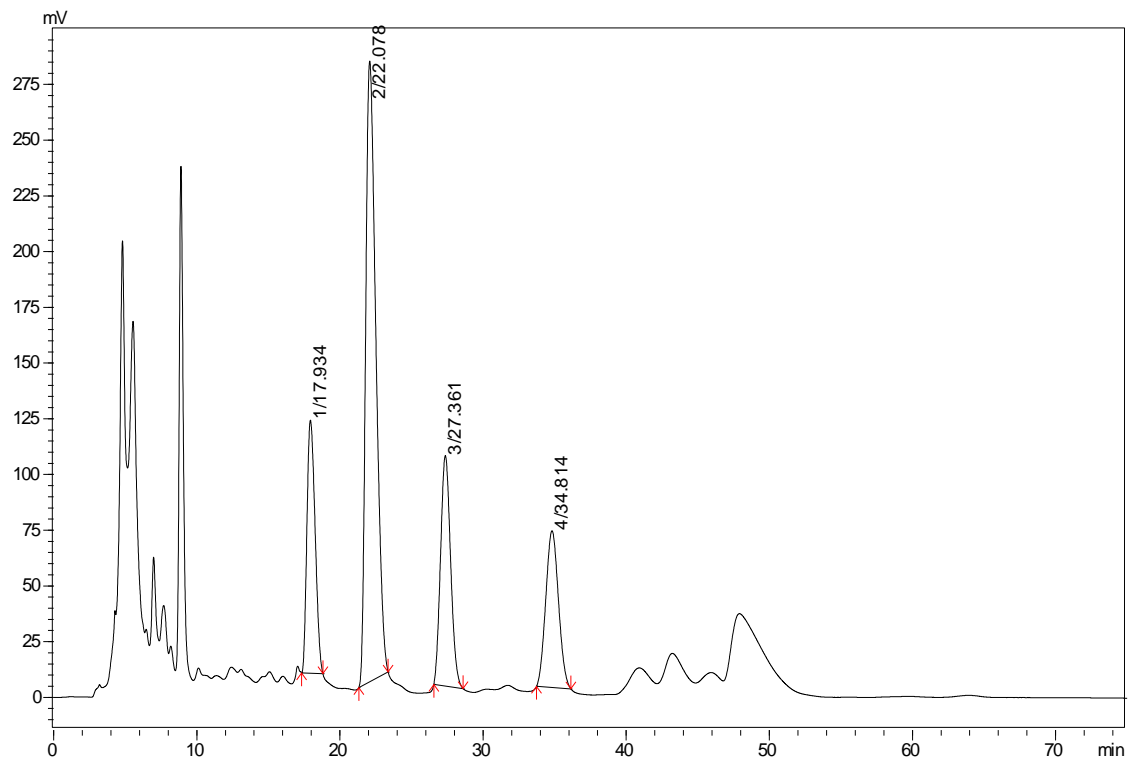


Figura B3 – Cromatograma obtido no HPLC da variedade Mantiqueira.

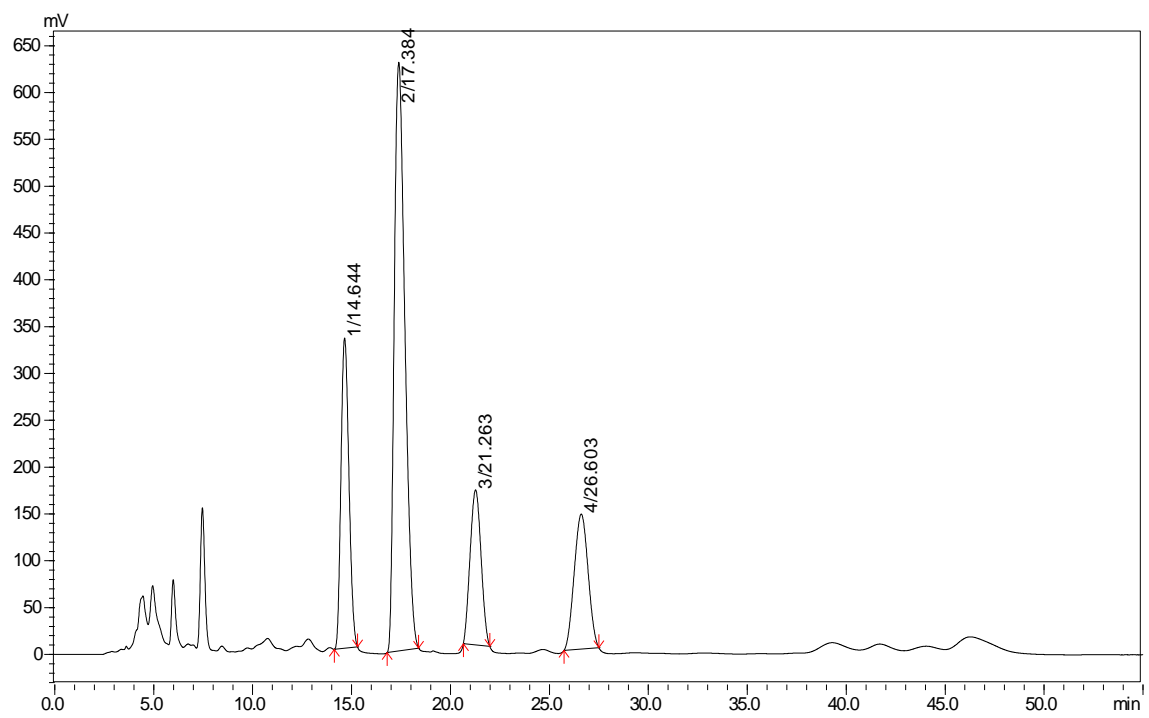


Figura B4 – Cromatograma obtido no HPLC da variedade Victoria.

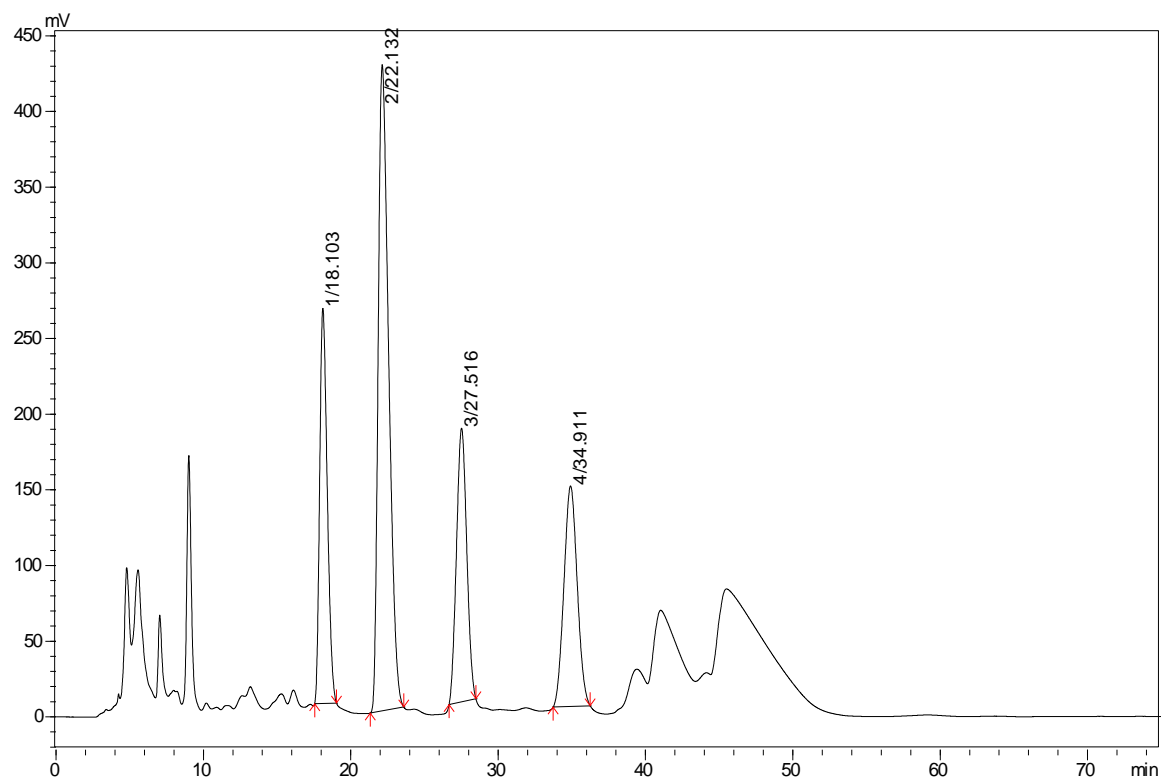


Figura B5 – Cromatograma obtido no HPLC da variedade Canastra.

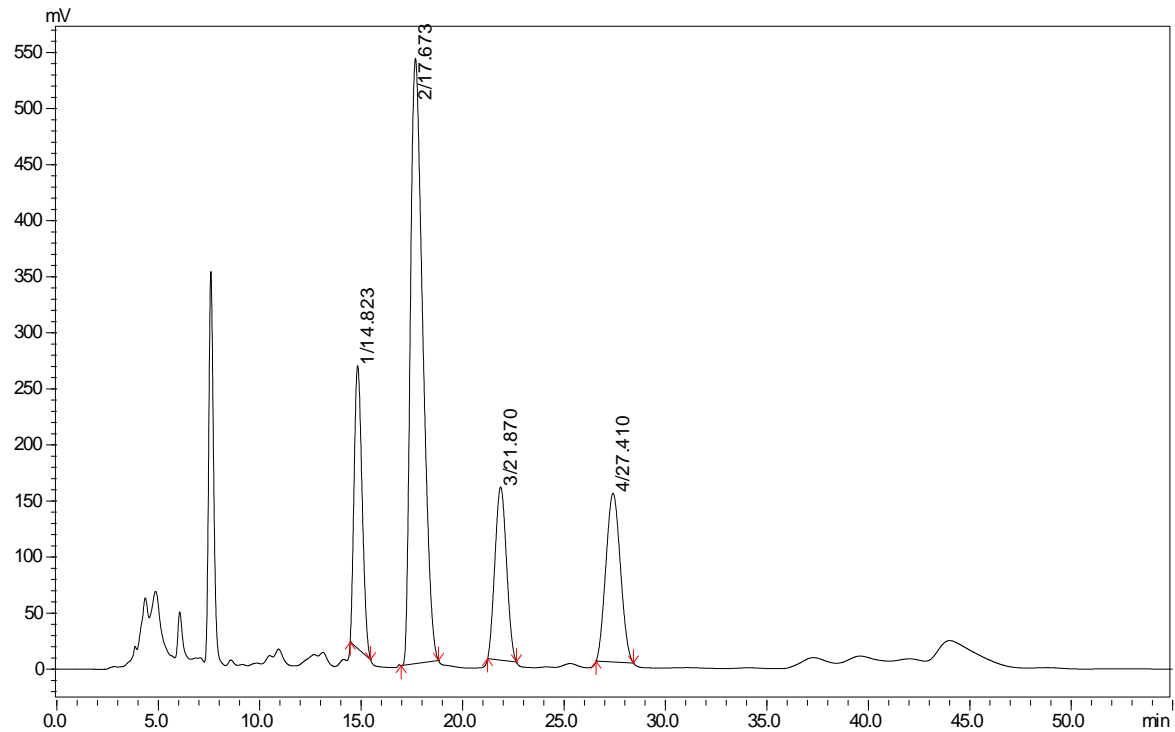


Figura B6 – Cromatograma obtido no HPLC da variedade Saaz 1 (Colhido em 18/12/17)

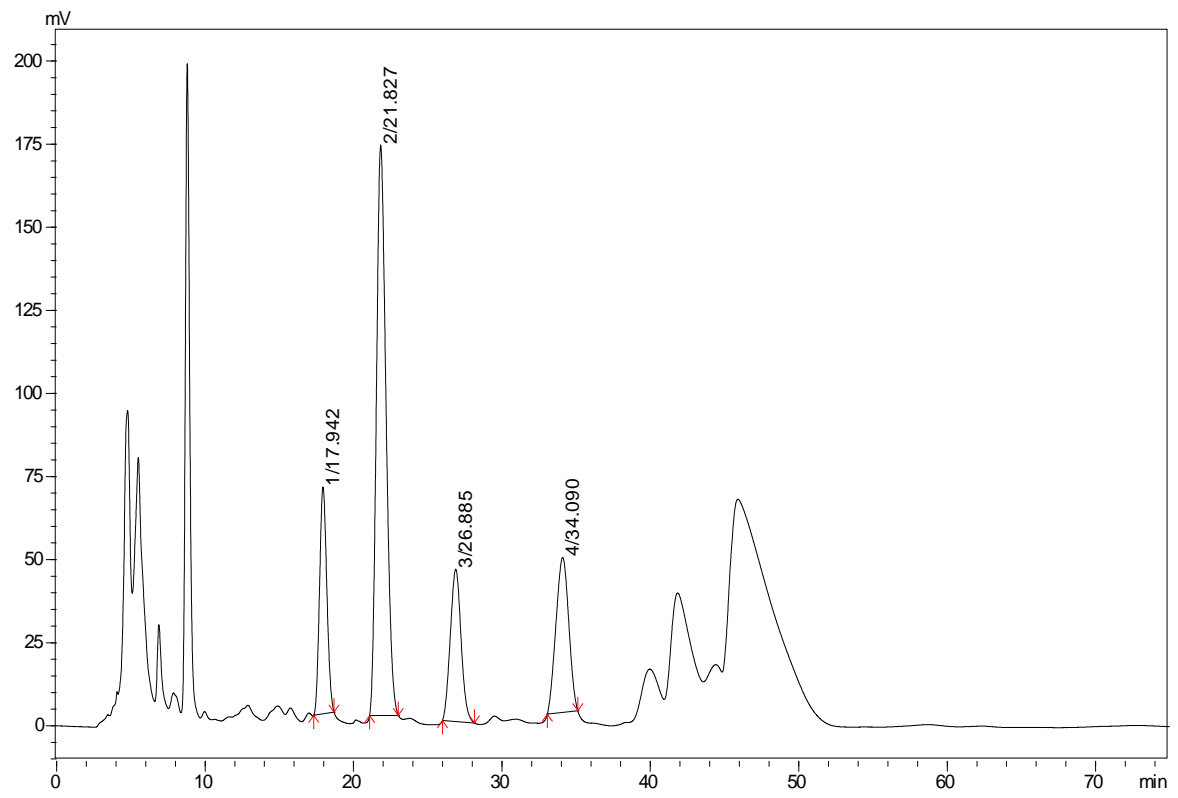


Figura B7 – Cromatograma obtido no HPLC da variedade Saaz 2 (Colhido em 10/02/18).

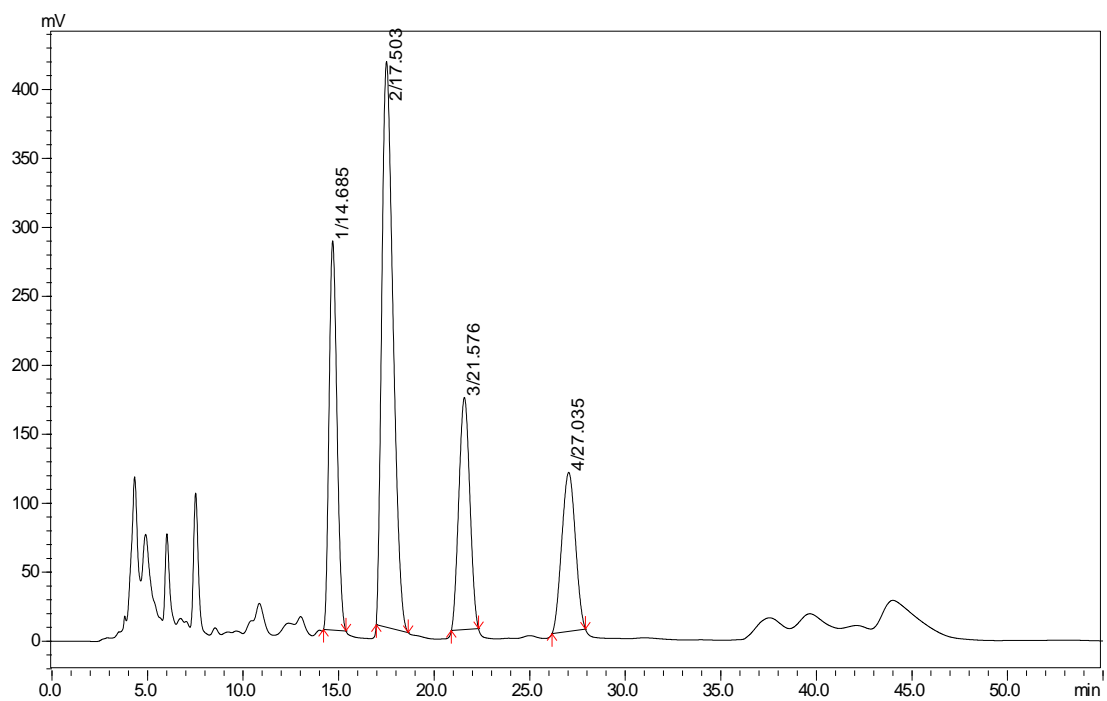


Figura B8 – Cromatograma obtido no HPLC da variedade Cascade.

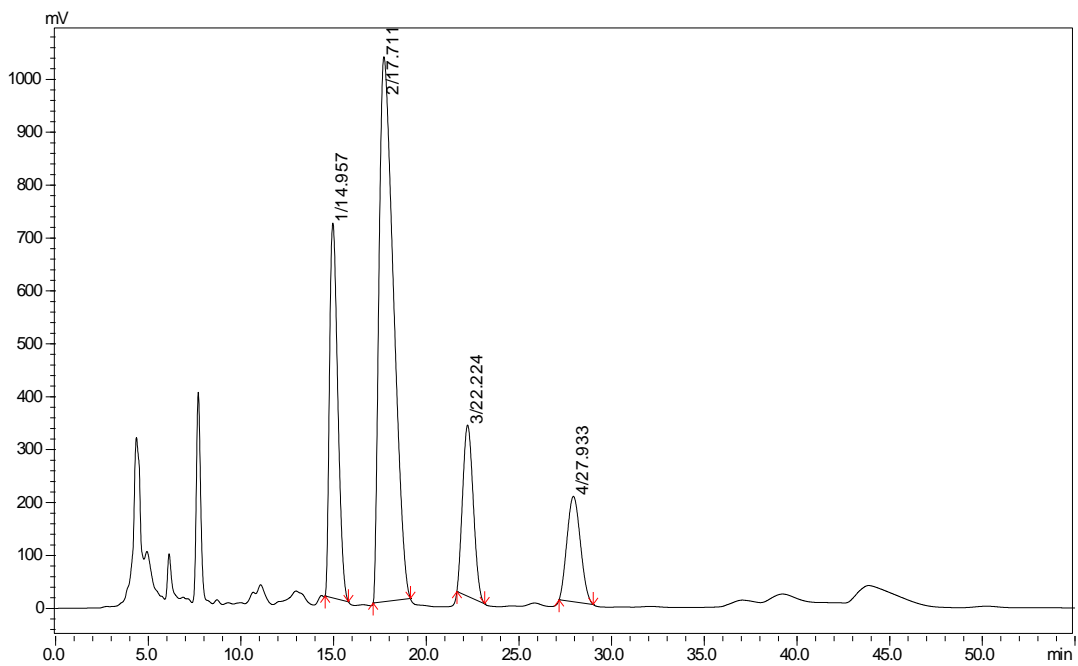


Figura B9 – Cromatograma obtido no HPLC da variedade Columbus.

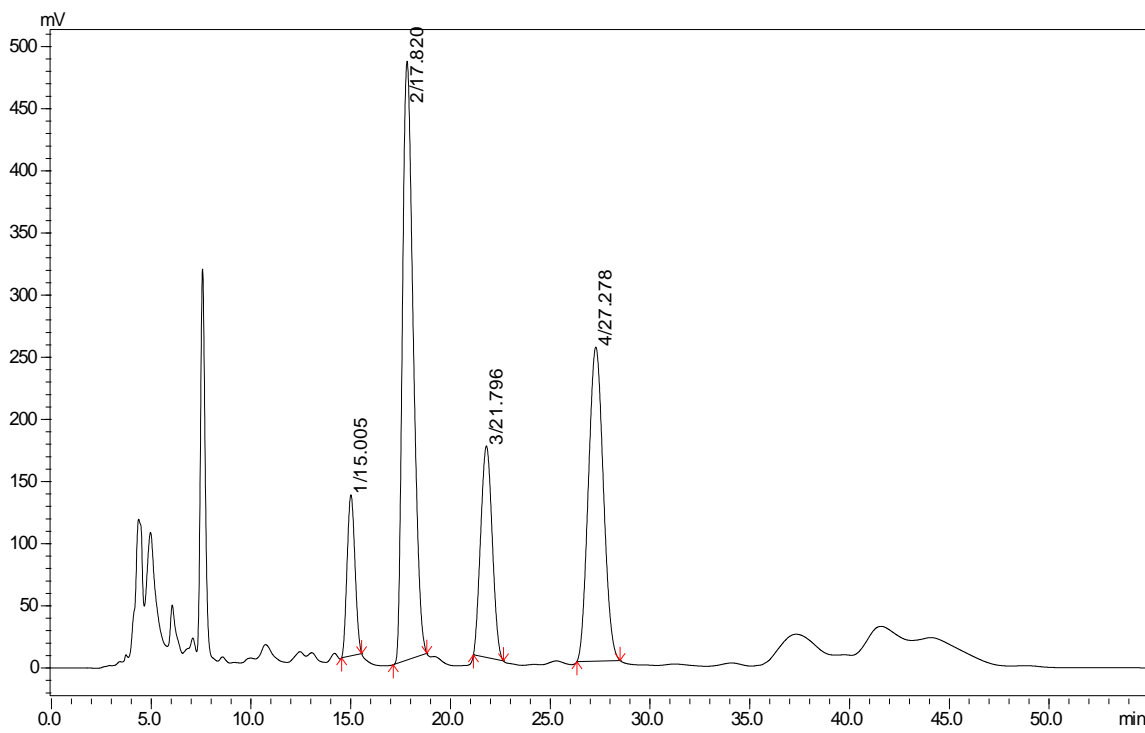


Figura B10 – Cromatograma obtido no HPLC da variedade Brazilisk.

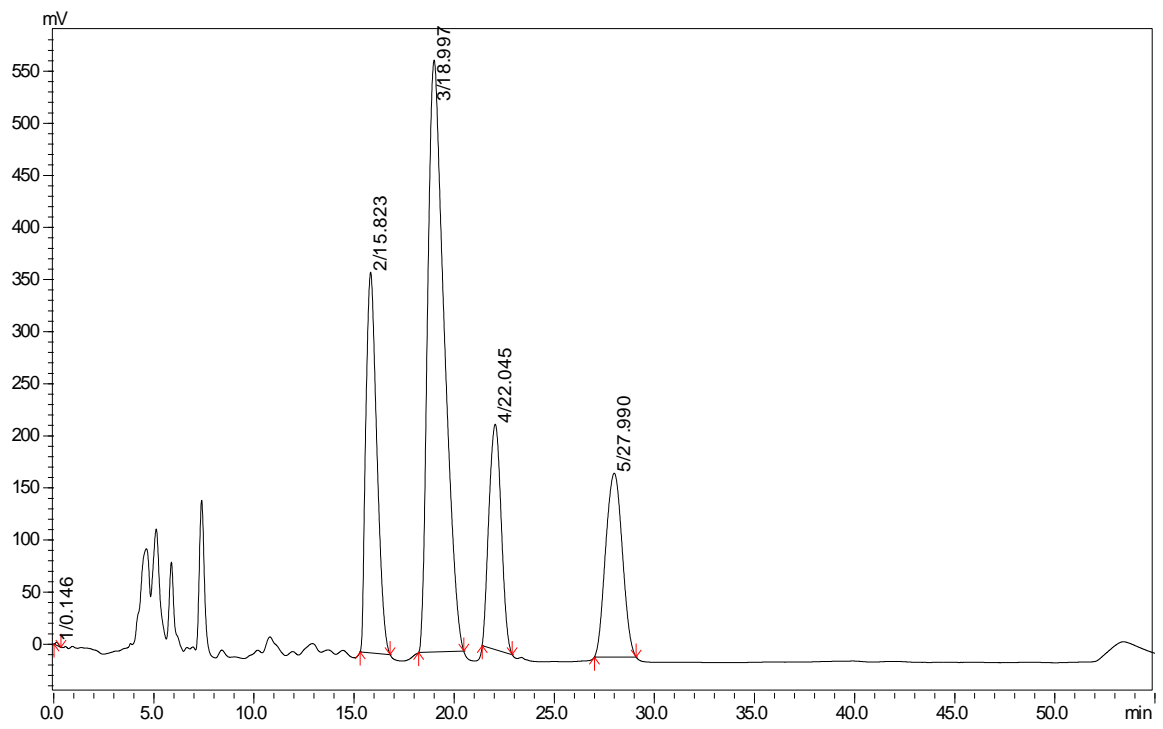


Figura B11 – Cromatograma obtido no HPLC da variedade Bullion.

ANEXO C – Cromatogramas obtidos no HPLC de lúpulo comercial

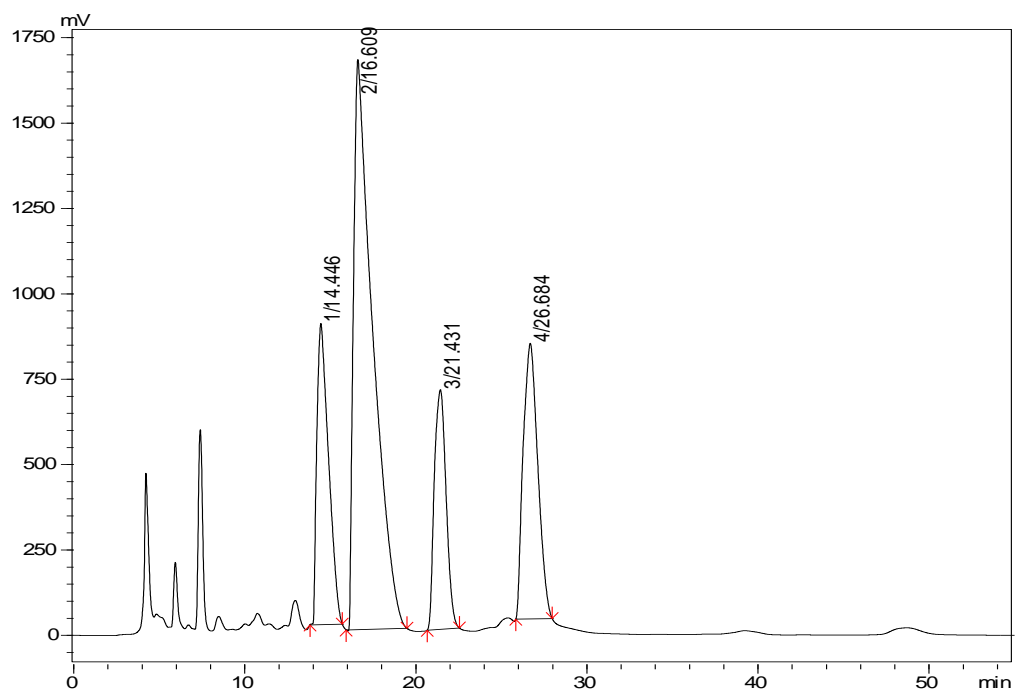


Figura C1 - Cromatograma obtido no HPLC da variedade comercial Hallertauer Magnum.

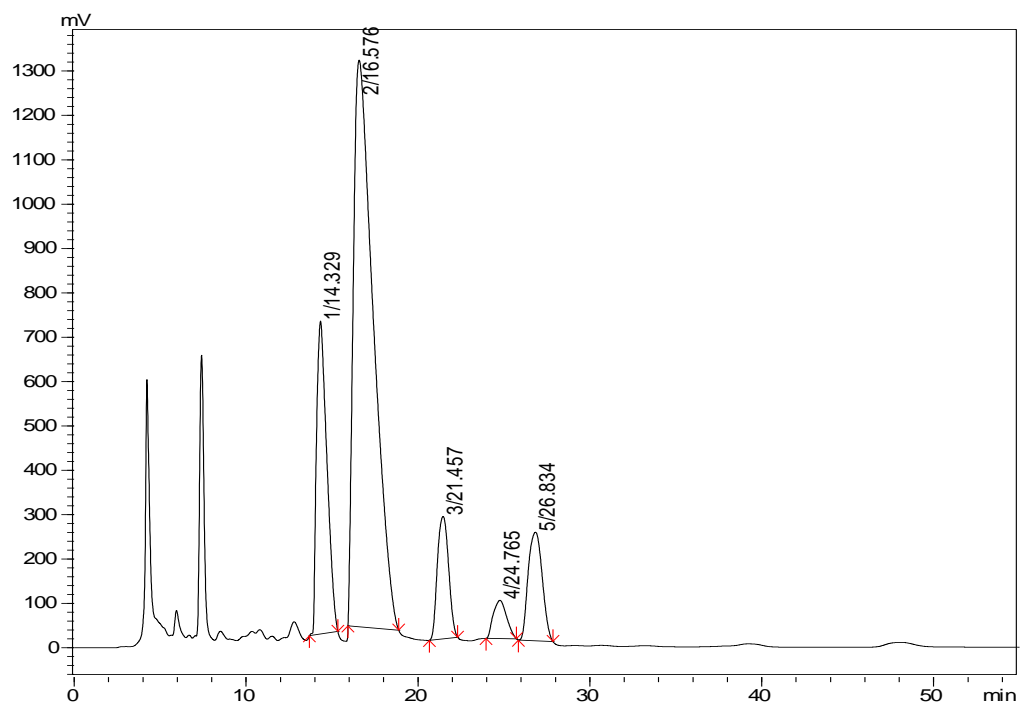


Figura C2 - Cromatograma obtido no HPLC da variedade comercial Citra.

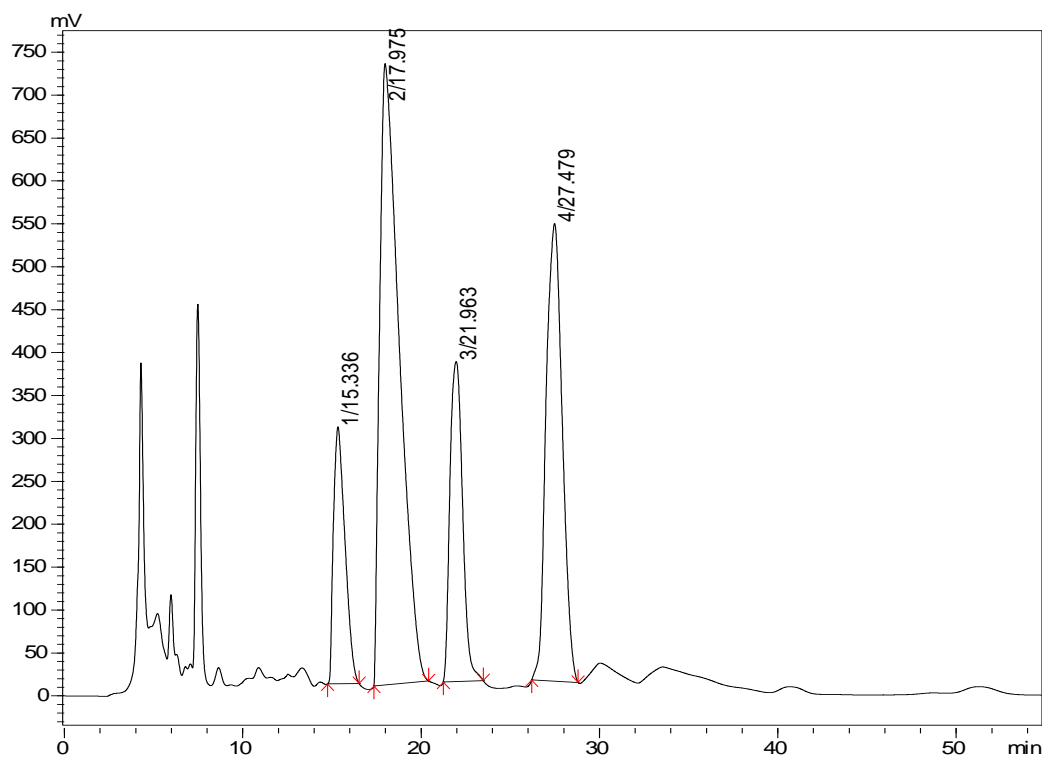


Figura C3 - Cromatograma obtido no HPLC da variedade comercial Czech Premiant.