

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI – CÂMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

BRUNO FISCHER

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO DE
LÚPULO (*Humulus lupulus*) POR HIDRODESTILAÇÃO E EXTRAÇÃO COM CO₂
SUBCRÍTICO

ERECHIM – RS

2021

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI – CÂMPUS DE ERECHIM
DEPARTAMENTO DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO DE
LÚPULO (*Humulus lupulus*) POR HIDRODESTILAÇÃO E EXTRAÇÃO COM CO₂
SUBCRÍTICO

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da URI Erechim - RS como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim.

Orientadores: Prof. Dr. Alexander Junges
Prof. Dra. Natalia Paroul

ERECHIM – RS
2021

BRUNO FISCHER

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO DE
LÚPULO (*Humulus lupulus*) POR HIDRODESTILAÇÃO E EXTRAÇÃO COM CO₂
SUBCRÍTICO**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos da URI Erechim - RS como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos. Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Alexander Junges (Orientador)
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

Prof. Dr^a. Natalia Paroul (Orientadora)
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

Prof. Dr. Rogério Luis Cansian
Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Erechim

Prof. Dr. Klebson Silva Santos
Instituto de Tecnologia e Pesquisa - ITP Aracajú – SE

ERECHIM – RS

2021

F529o Fischer, Bruno

Obtenção e caracterização de óleo essencial e extrato de lúpulo (*Humulus lupulus*) por hidrodestilação e extração com CO₂ subcrítico. – 2021.
70 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2021.

“Orientação: Prof. Dr. Alexander Junges, Prof. Dra. Natalia Paroul.”

1.Compostos voláteis 2. Dióxido de carbono 3. Bioatividade I. Título

C.D.U.: 664

Catálogo na fonte: bibliotecária Sandra Milbrath CRB 10/1278

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus e aos benfeitores pela luz e auxílio na concretização deste trabalho. Por mais dificuldades que possam surgir, sempre estamos amparados.

À minha família por estar sempre presente e pelo incentivo durante esta caminhada, em especial a minha namorada Aline pelo apoio, pela preocupação comigo e pela compreensão.

Aos professores orientadores Alexander Junges e Natalia Paroul pela orientação durante a pesquisa e desenvolvimento do projeto, e por todos os ensinamentos.

Aos professores Rogério Luis Cansian e Klebson Silva Santos por aceitarem fazer parte da banca de avaliação e contribuir para o melhoramento do trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório Paulo, Renan, Diego, Diane, Bruna e ao Igor de Aracaju pela amizade, pelos momentos de descontração e por toda ajuda durante o desenvolvimento do projeto.

Às Profes Sandy e Rosi pela amizade e companheirismo, pelas contribuições com a realização do trabalho e por estarem sempre dispostas a me auxiliar.

À Cervejaria Ágape pela contribuição neste trabalho com a matéria prima utilizada nas extrações, em especial ao Valmor que está sempre inovando e incentivando a pesquisa e a Andréia pelo auxílio.

À Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus de Erechim pela parceria e realização das análises cromatográficas.

À URI Campus de Erechim pela infraestrutura necessária para realização deste trabalho.

Meus sinceros agradecimentos!

Resumo da Dissertação apresentação ao Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATO DE LÚPULO (*Humulus lupulus*) POR HIDRODESTILAÇÃO E EXTRAÇÃO COM CO₂ SUBCRÍTICO

Bruno Fischer

Fevereiro/2021

O lúpulo é uma planta com grande importância medicinal e industrial. A principal aplicação é na indústria cervejeira para conferir aroma e amargor à bebida. Os α e β -ácidos do lúpulo são precursores do sabor amargo, enquanto os óleos essenciais são responsáveis pelos aromas. Existe uma grande variedade de lúpulos, cada um com uma finalidade de aplicação e com características químicas distintas. A escolha da técnica para extração de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais depende da classe de compostos que se deseja obter e da finalidade de aplicação do extrato. O objetivo deste estudo foi caracterizar óleos essenciais e extratos de lúpulo de diferentes variedades, obtidos por hidrodestilação e extração em sistema pressurizado, empregando o dióxido de carbono (CO₂) no estado subcrítico. Foram utilizadas quatro variedades de lúpulo para a extração, El dorado, Polaris, Hallertau-Blanc e Callista. As extrações por hidrodestilação foram realizadas em um aparelho do tipo Clevenger durante 120 minutos. A extração utilizando CO₂ subcrítico foi realizada nas condições de 100 bar e 7 °C. Foram determinadas cinéticas de extração empregando CO₂ subcrítico em tempos de 0–150 minutos. O perfil químico dos óleos essenciais foram determinados por cromatografia gasosa. A caracterização dos extratos quanto ao teor total de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu e de flavonoides por método colorimétrico utilizando nitrato de alumínio. Também foi avaliada a atividade antioxidantes dos óleos e extratos pelo método DPPH e a atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella choleraesuis* pelo método de difusão em discos. As extrações por hidrodestilação apresentaram rendimentos entre 0,38 e 1,44% (m/m), enquanto as extrações subcríticas apresentaram de 8,35 a 15,18% (m/m) de rendimento. Através da análise cinética sugere-se 60 minutos para El dorado e 80 minutos para os demais lúpulos como tempo ideal de extração. O composto majoritário em comum presente nos quatro óleos essenciais foi o β -mirceno. Os extratos por CO₂ subcrítico apresentaram teor de compostos fenólicos totais semelhantes entre 81,48 e 82,13 mgEAG/g e de flavonoides de 22,57 a 37,02 mgEQ/g. As atividades antioxidantes dos extrato de lúpulo foram satisfatórias e significativamente maiores que dos óleos essenciais. Os óleos essenciais não mostraram potencial antimicrobiano contra os microrganismos estudados, enquanto o extrato da variedade El dorado mostrou inibição parcial de *L. monocytogenes*; Polaris para *E. coli* e *S. choleraesuis* e Callista para *S. choleraesuis*. Os óleos essenciais e extratos de lúpulo obtidos neste trabalho tem potencial para serem empregados na indústria cervejeira como aromatizantes e antioxidantes naturais.

Palavras chaves: α e β -ácidos, compostos voláteis, dióxido de carbono, bioatividade.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirement for the degree of Master in Food Engineering.

**OBTAINING AND CHARACTERIZATION OF ESSENTIAL OIL AND HOP
EXTRACT (*Humulus lupulus*) BY HYDRODESTILLATION AND SUBCRITICAL
CO₂ EXTRACTION**

Bruno Fischer

February/2021

Hops are a plant of great medicinal and industrial importance. The main application is in the brewing industry to add aroma and bitterness to the drink. The α and β -acids of the hops are precursors of the bitter taste, while the essential oils are responsible for the aromas. There is a wide variety of hops, each with an application purpose and with different chemical characteristics. The choice of the technique for extracting bioactive compounds from plant matrices depends on the class of compounds you want to obtain and the purpose of applying the extract. The purpose of this study was to characterize essential oils and hops extracts of different varieties, obtained by hydrodistillation and extraction in a pressurized system, using carbon dioxide (CO₂) in the subcritical state. Four varieties of hops were used for the extraction, El dorado, Polaris, Hallertau-Blanc and Callista. Hydrodistillation extractions were performed in a Clevenger-type device for 120 minutes. Extraction using subcritical CO₂ was carried out at 100 bar and 7 °C. Extraction kinetics were determined using subcritical CO₂ in times of 0–150 minutes. The chemical profile of essential oils was determined by gas chromatography. The characterization of the extracts as to the total content of total phenolic compounds was carried out by the method of Folin-Ciocalteu and of flavonoids by colorimetric method using aluminum nitrate. The antioxidant activity of oils and extracts was also evaluated by the DPPH method and the antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella choleraesuis* using the disc diffusion method. Hydrodistillation extractions yielded between 0.38 and 1.44% (w/w), while subcritical extractions yielded 8.35 to 15.18% (w/w). Through kinetic analysis, it is suggested 60 minutes for El dorado and 80 minutes for other hops as the ideal extraction time. The major common compound present in the four essential oils was β -mycrene. The extracts by subcritical CO₂ had a similar content of total phenolic compounds between 81.48 and 82.13 mgGAE/g and flavonoids from 22.57 to 37.02 mgQE/g. The antioxidant activities of hop extracts were satisfactory and significantly higher than that of essential oils. The essential oils did not show antimicrobial potential against the microorganisms studied, while the extract of the variety El dorado showed partial inhibition of *L. monocytogenes*; Polaris for *E. coli* and *S. choleraesuis* and Callista for *S. choleraesuis*. The essential oils and hop extracts obtained in this work have the potential to be used in the brewing industry as natural flavorings and antioxidants.

Key words: α and β -acids, bioactivity, carbon dioxide, volatile compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Condução da planta <i>H. lupulus</i> , inflorescências e lúpulo em <i>pellets</i>	16
Figura 2: Corte transversal de uma inflorescência de lúpulo carregado de lupulina.....	18
Figura 3: Frações das resinas do lúpulo e seus respectivos compostos.....	18
Figura 4: Estruturas químicas dos α -ácidos (humulonas) e β -ácidos (lupulonas) do lúpulo....	19
Figura 5: Estrutura química do Xantohumol e de flavonas presentes no lúpulo.....	21
Figura 6: Estrutura química de hidrocarbonetos, compostos oxigenados e sulfurados encontrados no óleo essencial de lúpulo.....	22
Figura 7: Aparelho tradicional de extração Soxhlet.	28
Figura 8: Aparelho para hidrodestilação tipo Clevenger.....	29
Figura 9: Diagrama de fases típico de uma substância pura.....	34
Figura 10: Unidade de extração com fluidos pressurizados.....	38
Figura 11: Rendimento global de extração de lúpulo por hidrodestilação e extração subcrítica.	42
Figura 12: Aspecto visual do extrato de lúpulo (Polaris) obtidos por extração pressurizada com CO ₂ subcrítico.	43
Figura 13: Cinéticas de extração dos lúpulos El dorado, Polaris, H-Blanc e Callista, empregando dióxido de carbono subcrítico.	44
Figura 14: Relação de rendimento de extrato e consumo de solvente no decorrer da extração.	45
Figura 15: Estrutura química do β -selineno e α -guaïeno.	48
Figura 16: Teste de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de lúpulo das variedades El dorado, Polaris, H-Blanc e Callista.....	52
Figura 17: Teste de atividade antimicrobiana dos extratos de lúpulo das variedades El dorado, Polaris, H-Blanc e Callista.....	53
Figura 18: Cromatograma do óleo essencial de lúpulo El dorado por CG-EM.	69
Figura 19: Cromatograma do óleo essencial de lúpulo Polaris por CG-EM.....	69
Figura 20: Cromatograma do óleo essencial de lúpulo H-Blanc por CG-EM.....	70
Figura 21: Cromatograma do óleo essencial de lúpulo Callista por CG-EM.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: α -ácidos e β -ácidos do lúpulo.....	19
Tabela 2: Características aromáticas de compostos presentes no óleo essencial de lúpulo.	23
Tabela 3: Trabalhos de extração de Lúpulo realizados por diferentes técnicas convencionais e não convencionais.....	26
Tabela 4: Características de solventes utilizados na EFS.....	35
Tabela 5: Características das variedades de lúpulo utilizadas para extração.	37
Tabela 6: Composição química dos óleos essenciais de lúpulo (El dorado, Polaris, H-Blanc e Callista) por análise de CG-EM.	47
Tabela 7: Teor total de compostos fenólicos e flavonoides de extratos de lúpulo.....	49
Tabela 8: Atividade antioxidante de óleos essenciais e extratos de lúpulo.....	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1. Lúpulo	15
3.2. Contexto Histórico do Lúpulo no Brasil.....	16
3.3. Compostos Químicos do Lúpulo.....	17
3.3.1. Resinas macias	18
3.3.2. Resinas Duras	20
3.3.3. Óleo Essencial	21
3.4. Técnicas de Extração de Lúpulo.....	24
3.4.1. Soxhlet.....	28
3.4.2. Maceração	29
3.4.3. Hidrodestilação.....	29
3.4.4. Extração Assistida por Ultrassom (EAU)	30
3.4.5. Extração Assistida por Campo Elétrico Pulsado.....	31
3.4.6. Extração Assistida por Enzima.....	31
3.4.7. Extração Assistida por Micro-ondas (EAM).....	32
3.4.8. Extração com Líquido Pressurizado (ELP)	33
3.4.9. Extração com Fluido Supercrítico/Subcrítico (EFS).....	34
3.5. Estado da Arte.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1. Matéria Prima	37
4.2. Hidrodestilação	37
4.3. Extração com fluido pressurizado.....	37

4.4.	Caracterização Química por CG-EM	39
4.5.	Teor de Compostos Fenólicos Totais.....	39
4.6.	Determinação de Flavonoides	40
4.7.	Atividade Antioxidante (DPPH)	40
4.8.	Atividade Antimicrobiana.....	41
4.9.	Análise Estatística	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1.	Óleo essencial e extratos de lúpulo	42
5.2.	Caracterização química dos óleos essenciais	46
5.3.	Fenólicos e flavonoides totais dos extratos de lúpulo.....	49
5.4.	Atividade Antioxidante.....	50
5.5.	Atividade antimicrobiana.....	51
6.	CONCLUSÕES	55
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	56
8.	REFERÊNCIAS	57
	APÊNDICE I.....	69

1. INTRODUÇÃO

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta de aplicação medicinal e de grande importância industrial no setor cervejeiro. Seus principais compostos são as humulonas (α -ácidos), responsáveis por conferir amargor à cerveja, as lupulonas (β -ácidos) responsáveis pelas atividades biológicas, os óleos essenciais responsáveis pelas características aromáticas de cervejas lupuladas, entre outros (DURELLO, SILVA & BOGUSZ JR., 2019). As variedades de lúpulo são classificadas em lúpulos de aroma, de amargor, ou de duplo propósito, de acordo com a finalidade de aplicação.

O lúpulo é comercializado no formato de pellets e a adição na cerveja ocorre durante a etapa de fervura do mosto, o que causa a evaporação de compostos voláteis e a degradação de compostos termolábeis. O interesse em extrair compostos de lúpulo é recuperar compostos de aroma e compostos com propriedades bioativas, para adicionar na cerveja posteriormente. Além disso, a substituição de aromatizantes e antioxidantes sintéticos, por óleos essenciais e extratos naturais de plantas é uma alternativa para desenvolver alimentos mais saudáveis e seguros.

Devido as propriedades sensoriais e biológicas, os extratos de lúpulo são produtos de alto valor agregado. Portanto, para obtenção dos compostos de interesse deve ser empregada uma técnica de extração adequada. A escolha do solvente está relacionada a seletividade dos compostos alvo pela polaridade, enquanto a técnica de extração influencia na eficiência do processo. Ambos são fatores importantes que devem ser considerados para obtenção de um produto de qualidade.

A hidrodestilação é uma técnica simples que permite a separação de compostos voláteis por evaporação. Já em uma extração com solvente podem ser recuperadas outras classes de compostos, inclusive de alto peso molecular. As técnicas de extração utilizando líquidos pressurizados (ELP) e fluidos supercríticos (EFS) ganharam destaques em muitas pesquisas. Nesta última, o dióxido de carbono (CO_2) é geralmente usado como solvente, devido as condições críticas moderadas (73,8 bar e 31,2 °C) e por não deixar resíduos tóxicos no extrato (GANDHI, ARORA & KUMAR, 2017).

A eficiência de extração com CO_2 em sistemas pressurizados está diretamente ligada as condições de temperatura e pressão utilizadas. Estas variáveis influenciam na densidade e viscosidade do solvente e, portanto, em seu poder de solvatação, difusividade e solubilidade dos compostos no CO_2 . A maioria dos trabalhos de extração empregam o CO_2 no estado supercrítico, contudo, a utilização de condições subcríticas, em baixas temperaturas foram pouco exploradas.

Neste contexto, esse estudo teve como objetivo obter e caracterizar óleos essenciais e extratos de quatro variedades diferentes de lúpulo, com o propósito de aplicação na indústria cervejeira. Foram exploradas as propriedades solventes do CO₂ no estado subcrítico, comparando a técnica de extração em sistema pressurizado com a técnica convencional de hidrodestilação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Obter e caracterizar óleos essenciais e extratos de lúpulo das variedades El dorado, Polaris, H-Blanc e Callista, empregando hidrodestilação e dióxido de carbono em condições subcríticas como solvente.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Obter óleos essenciais de diferentes variedades de lúpulo por hidrodestilação e caracterizar o perfil químico;
- ✓ Obter extratos de diferentes variedades de lúpulo em sistema pressurizado e determinar as cinéticas de extração utilizando dióxido de carbono como solvente em condições subcríticas;
- ✓ Caracterizar os extratos de lúpulo quanto ao teor total de compostos fenólicos e flavonoides;
- ✓ Avaliar e comparar o potencial antioxidante e antimicrobiano dos óleos essenciais e dos extratos de lúpulo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste item foi abordada a fundamentação teórica necessária para o desenvolvimento deste trabalho, apresentando tópicos sobre as características da planta *Humulus lupulus*, bem como os compostos químicos de interesse, e as técnicas convencionais e não convencionais utilizadas na extração a partir de matrizes vegetais.

3.1. Lúpulo

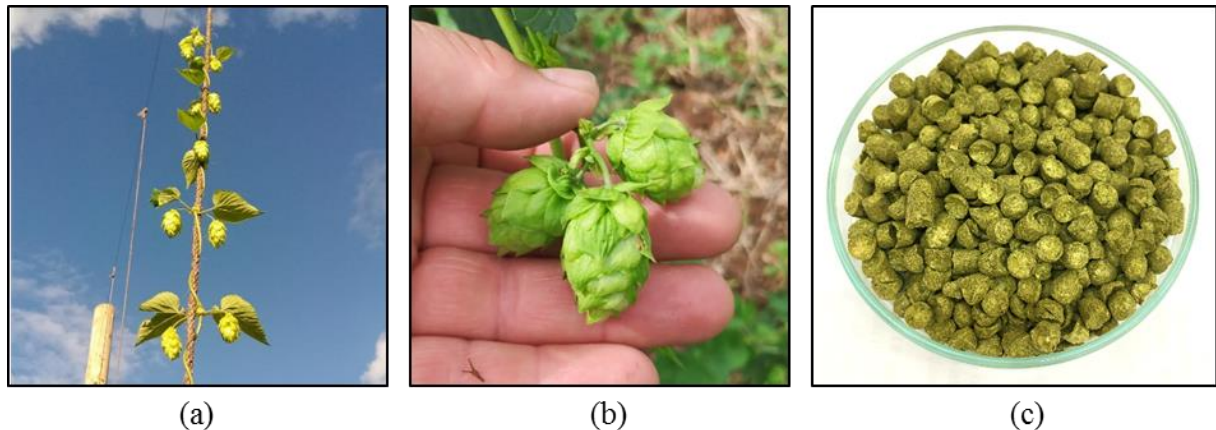
Humulus lupulus L. é uma planta perene e trepadeira da família Cannabaceae, de aplicação medicinal e industrial. *H. lupulus* tem destaque na indústria cervejeira devido as suas propriedades organolépticas derivadas de ácidos orgânicos amargos, óleos essenciais, resinas e compostos polifenólicos (KESKIN et al., 2019). Além da indústria cervejeira, os extratos de lúpulo são empregados também em medicamentos fitoterápicos, suplementos alimentares, bebidas funcionais e cosméticos (PRENCIPE et al., 2014).

Na área da medicina, o lúpulo tem sido utilizado no tratamento de insônia, ansiedade, irritação, delírio, excitabilidade e inquietação associadas a cefaleia tensional, sintomas depressivos e distúrbios digestivos, como espasmo gastrointestinal (DI VIESTI et al., 2011; NUUTINEN, 2018). Alguns estudos abordam o efeito estrogênico de extratos de lúpulo, com potencial para o tratamento dos sintomas de menopausa e pós-menopausa nas mulheres (MILLIGAN et al., 2000; CHADWICK, PAULI & FARNSWORTH, 2004; KEILER et al., 2017; ŠTULÍKOVÁ et al., 2018).

O lúpulo é uma espécie de qualidade instável que varia de acordo com o clima, aspectos da raiz (idade, infecções) e condições de cultivo como fertilização, poda e colheita. Nas plantações o lúpulo brota da raiz durante a primavera e sobe através de fios entrelaçados (Figura 1a). Atinge altura de 6 - 8 m em 3 meses após a germinação e floresce no início do verão. As inflorescências, conhecidas como cones de lúpulo (Figura 1b), são colhidas dentro do período de um a dois meses após a floração (MATSUI et al., 2016).

A forma mais comum de comercialização e utilização do lúpulo é em *pellets*, pequenas pelotas de flores prensada conforme apresentado na Figura 1 (c). Essa forma de comercialização visa reduzir o volume do lúpulo para o transporte e preservar suas características originais, mas nada impede que a flor seja adicionada à cerveja na sua forma natural (MEGA, NEVES & ANDRADE, 2011).

Figura 1: Condução da plana *H. lupulus* (a), inflorescências (b), e lúpulo em *pellets* (c).



Fonte: O Autor (2021).

As variedades de lúpulo são geralmente classificadas, em função do alto ou baixo teor de α -ácidos, como lúpulo de amargor ou de aroma respectivamente. Ainda, existem algumas variedades de amargor que são ricas em compostos aromáticos e podem ser classificadas como lúpulos de duplo propósito (MACHADO JR. et al., 2019). O teor de α -ácidos nos cones de lúpulo variam de 2 – 11% nas cultivares aromáticas e de 12 – 19% nas cultivares de amargor (HOPSTEINER, 2020).

Os α -ácidos e a fração do óleo essencial armazenada nas glândulas de lupulina do lúpulo conferem os aromas e sabores predominantes na cerveja. Os aromas do lúpulo na cerveja são atribuídos ao óleo essencial, enquanto os α -ácidos constituem a principal fonte de amargor derivado do lúpulo na cerveja (SHARP et al., 2014).

De acordo com dados publicados em novembro de 2020 pela Hopsteiner (2020), a área utilizada para o cultivo do lúpulo em todo mundo foi de 62.850 ha, sendo 24.896 ha nos EUA e 20.706 ha na Alemanha. As estimativas indicam que a quantidade de lúpulo produzido em todo mundo foi de 122.363 ton, sendo os EUA (48.869,4 ton) e a Alemanha (46.759,8 ton) os principais países produtores.

3.2. Contexto Histórico do Lúpulo no Brasil

De acordo com Baierle (2020) existem muitos relatos sobre a chegada do lúpulo no Brasil, porém, pouco documentados. O primeiro documento técnico que descreve agronomicamente a cultura do lúpulo foi publicado no Brasil por uma Revista Agrícola do Rio de Janeiro no ano de 1885 (CAMINHOÁ, 1885). No Rio Grande do Sul, existem relatos que o

cultivo experimental de lúpulo começou por volta de 1953, na região de Nova Petrópolis, e mesmo enfrentando algumas dificuldades, foram obtidos resultados animadores (IBGE, 1959).

Houve muitas tentativas de cultivo de lúpulo no Brasil mas sem sucesso devido ao clima desfavorável do país. Isso porque a planta é cultivada principalmente em climas frios, como nos países do Norte (ALMEIDA et al., 2020). É possível que, para suprir a demanda de lúpulo no Brasil, a importação se tornou mais viável que a produção, uma vez que o país é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo (HOPSTEINER, 2020).

Em 2016, no município de São Bento do Sapucaí (SP) foi noticiado a primeira produção de lúpulo em grande escala no Brasil. O cultivo da variedade Cascade na região da Serra da Mantiqueira rendeu cerca de 2000 kg de lúpulo (DA ROSA ALMEIDA et al., 2020). Atualmente no Brasil, há produtores nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Distrito Federal, contudo ainda não existem dados de produção brasileira de lúpulo (FAGHERAZZI et al. 2018).

Com o crescente interesse de produzir lúpulo no Brasil, algumas organizações surgiram com o objetivo de desenvolver a cultura do lúpulo no Brasil. Dentre elas, a *HopsBrasil*, criada em 2015; *SteinHops*, criada em 2020; e a Associação Brasileira de Produtores de Lúpulo – APROLÚPULO, criada em 2018. Além disso alguns eventos já vem sendo realizados como o Encontro Brasileiro de Pesquisadores e Produtores de Lúpulo - ENBRALÚPULO realizado em Botucatu – SP no ano de 2019.

3.3. Compostos Químicos do Lúpulo

A química envolvida por trás dos compostos provenientes do lúpulo é extremamente complexa e está longe de ser totalmente compreendida (EYRES & DUFOUR, 2009; VOLLMER, LAFONTAINE & SHELLHAMMER, 2018). Os metabólitos secundários de interesse, produzidos pelas inflorescências femininas, são sintetizados nas glândulas de lupulina na forma de um pó resinoso amarelo (BERTELLI et al., 2018), conforme mostra a Figura 2.

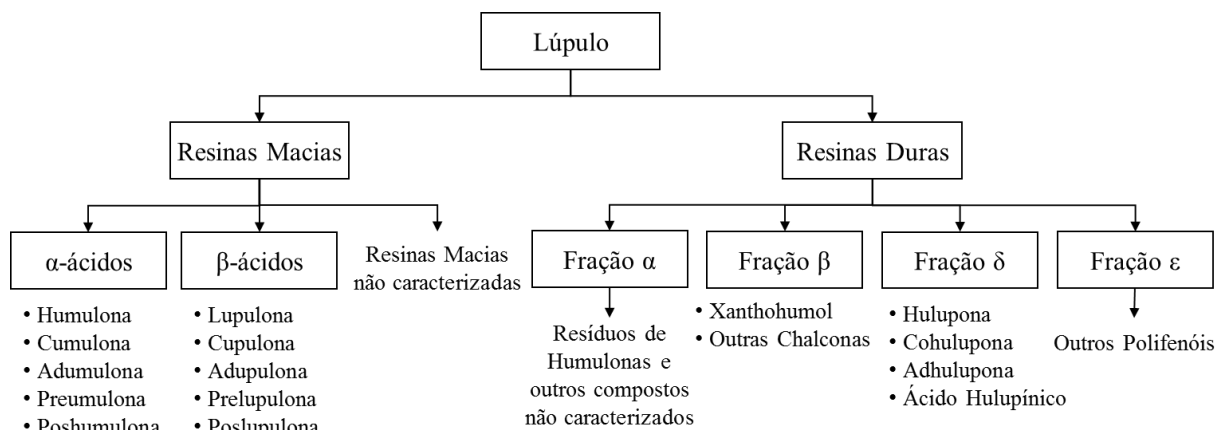
A lupulina contém de 15-30% de resina em peso seco, pode ser dividida em duas subcategorias: as resinas macias, substâncias que são solúveis em n-hexano; e as resinas duras, compostos não solúveis em n-hexano (BERTELLI et al., 2018). O conteúdo das resinas e dos óleos essenciais depende de muitos fatores, relacionados à planta e às condições de cultivo, podendo variar bastante (OCVIRK, NECEMER & KOSIR, 2019). A Figura 3 apresenta um esquema resumindo dos principais constituintes das resinas do lúpulo.

Figura 2: Corte transversal de uma inflorescência de lúpulo carregado de lupulina.



Fonte: LEWIS (2016).

Figura 3: Frações das resinas do lúpulo e seus respectivos compostos.



Fonte: Adaptado de DURELLO, SILVA & BOGUSZ JR. (2019).

3.3.1. Resinas macias

Os α -ácidos ou humulonas são usados como precursores dos iso- α -ácidos, os principais compostos responsáveis pelo amargor da cerveja, além de contribuírem fortemente para a estabilidade da espuma e inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas, como *Lactobacillus* (STEENACKERS, DE COOMAN & DE VOS, 2015). As humulonas possuem características de ácido fraco (pKa de 4,0 a 5,5) e pouca solubilidade em água. Após sofrerem a isomerização em condições de alta temperatura, a solubilidade aumenta. Durante a isomerização cada humulona gera seus dois diastereoisômeros na forma de cis-iso-humulona e trans-iso-humulona (DURELLO, SILVA & BOGUSZ JR., 2019).

Os β -ácidos ou lupulonas são análogos triprenilados dos α -ácidos, estruturalmente muito semelhantes, contudo são ainda menos solúveis em água (pKa de 4,0 a 7,8) devido à ausência

de um grupo alcoólico terciário no anel aromático. Ao contrário das humulonas, os β -ácidos não sofrem isomerização, mas são suscetíveis à oxidação, o que ocorre principalmente durante a secagem e armazenamento dos cones de lúpulo. A importância dos β -ácidos está associada a atividade biológica dessas moléculas por suas ações antioxidantes e antimicrobianas, que contribuem para a estabilidade e qualidade da cerveja (SKOMRA & KOZIARA-CIUPA, 2020; DURELLO, SILVA & BOGUSZ JR., 2019).

Os principais α -ácidos do lúpulo são a humulona, cohumulona, adhumulona, prehumulona e poshumulona; enquanto os principais β -ácidos do lúpulo são a lupulona, cupulona, adupulona, prelupulona e a poslupulona. A Figura 4 apresenta a estrutura química dos α e β -ácidos, onde a cadeia R respectiva de cada composto é apresentada na Tabela 1.

Figura 4: Estruturas químicas dos α -ácidos (humulonas) e β -ácidos (lupulonas) do lúpulo.

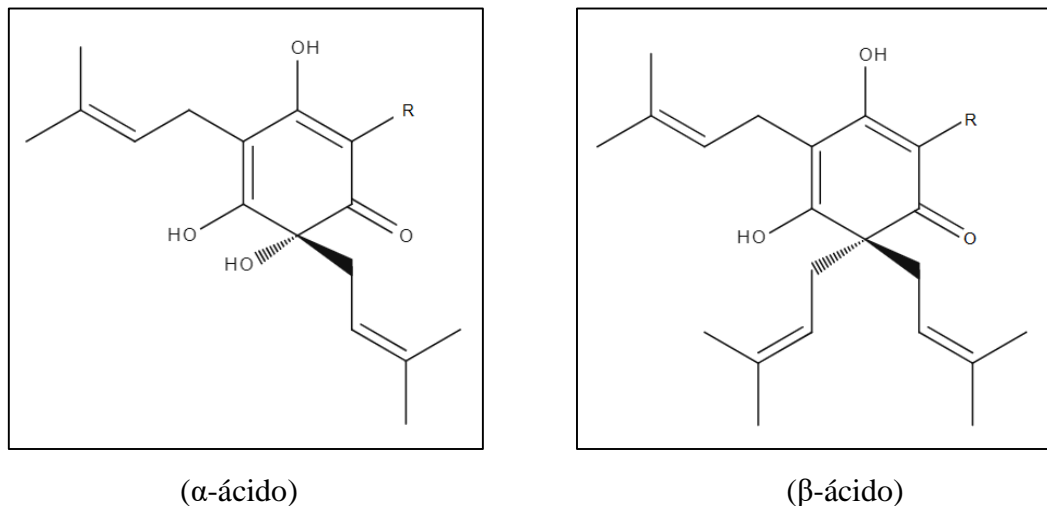


Tabela 1: α -ácidos e β -ácidos do lúpulo.

R	α -ácido	Fórmula	β -ácido	Fórmula
-COCH ₂ CH(CH ₃) ₂ (isovaleril)	Humulona	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	Lupulona	C ₂₆ H ₃₈ O ₄
-COCH(CH ₃) ₂ (isobutiril)	Cohumulona	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	Colupulona	C ₂₅ H ₃₆ O ₄
-COCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃ (2-metilbutiril)	Adhumulona	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	Adlupulona	C ₂₆ H ₃₈ O ₄
-COCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂ (4-metilpentanil)	Prehumulona	C ₂₂ H ₃₂ O ₅	Prelupulona	C ₂₇ H ₄₀ O ₄
-COCH ₂ CH ₃ (propionil)	Poshumulona	C ₁₉ H ₂₆ O ₅	Poslupulona	C ₂₄ H ₃₄ O ₄

Fonte: ZEKOVIC, SOVLJANSKI & GRUJIC (2007).

3.3.2. Resinas Duras

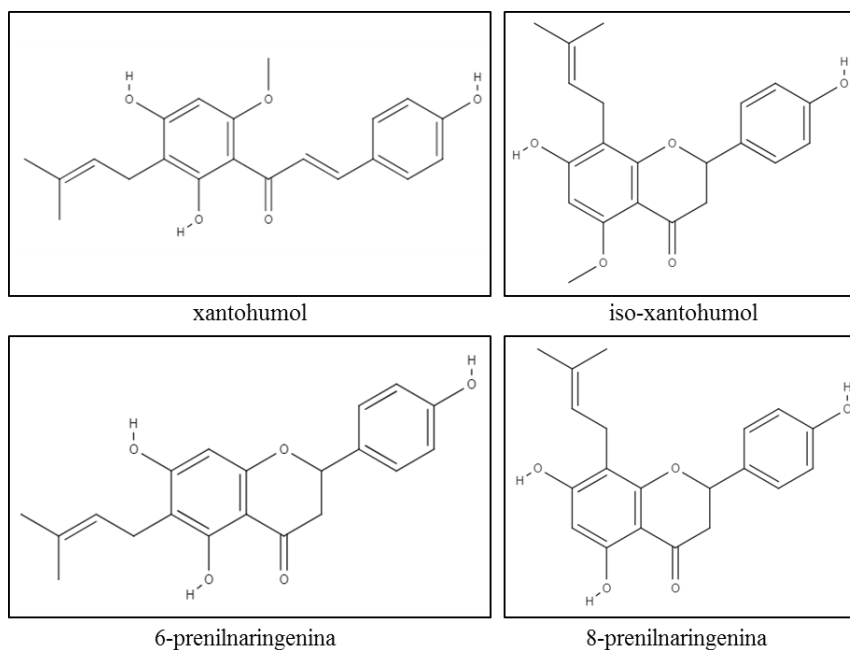
Por definição, as resinas duras do lúpulo são solúveis em metanol e éter dietílico, mas insolúveis em hexano, logo, são compostos mais polares em comparação com as resinas macias. Em geral, a maior parte das resinas duras surgem de reações de oxidação das resinas macias (ALMAGUER et al., 2015), ou seja são produtos da oxidação dos α -ácidos e β -ácidos. Principalmente em lúpulos armazenados em contato com o ar, foi identificado que o teor de α e β -ácidos diminui rapidamente devido a oxidação, enquanto a fração de resina dura aumenta (TANIGUCHI et al., 2015).

As humulonas e lupulonas, quando são oxidadas, dão origem as humulinonas e as huluponas, dois grupos de compostos com estrutura molecular semelhantes aos α -ácidos e β -ácidos, exceto pela presença de um grupo hidroxila a mais, que os tornam mais polares e mais solúveis na cerveja (MAYE, LEKER & SMITH, 2016). Ainda são poucos os estudos que abordaram as resinas duras, contudo alguns autores já investigaram e relataram os efeitos desses compostos no amargor da cerveja (TANIGUCHI et al., 2014; DRESEL, DUNKEL & HOFMANN, 2015; ALGAZZALI & SHELLHAMMER, 2016).

Além das humulonas e lupulonas, algumas chalconas preniladas e flavonas também fazem parte da resina dura do lúpulo. O xantohumulol é o principal prenilflavonóide do lúpulo além de outras 13 chalconas relacionadas. Normalmente as chalconas possuem uma hidroxila livre, o que permite a isomerização em suas flavonas correspondentes. As principais flavonas do lúpulo são o iso-xantohumulol, a 6-prenilnaringenina e 8-prenilnaringenina (STEVENS & PÁGINA, 2004; NIKOLIĆ & VAN BREEMEN, 2013). A Figura 5 apresenta a estrutura química destes compostos.

O xantohumulol tem apresentado efeitos biológicos interessantes, como a prevenção do câncer, efeito antiviral contra o HIV-1 e inibição da replicação do *Plasmodium falciparum*, o agente causador da malária; enquanto 8-prenilnaringenina, o desmetilado derivado de iso-xantohumulol, apresenta potencial de atividade fitostrogênica (STEENACKERS, COOMAN & DE VOS, 2015; DHOOGHE et al., 2010; GERHÄUSER, 2005a; GERHÄUSER, 2005b). O xantohumulol é encontrado única e exclusivamente no lúpulo, portanto a sua presença na dieta se dá apenas pelo consumo de cerveja. Contudo, a maior parte do xantohumulol é perdida na produção da cerveja durante a isomerização térmica (DURELLO, SILVA & BOGUSZ JR., 2019).

Figura 5: Estrutura química do Xantohumulol e de flavonas presentes no lúpulo.



Fonte: Adaptado de STEVENS & PÁGINA, 2004.

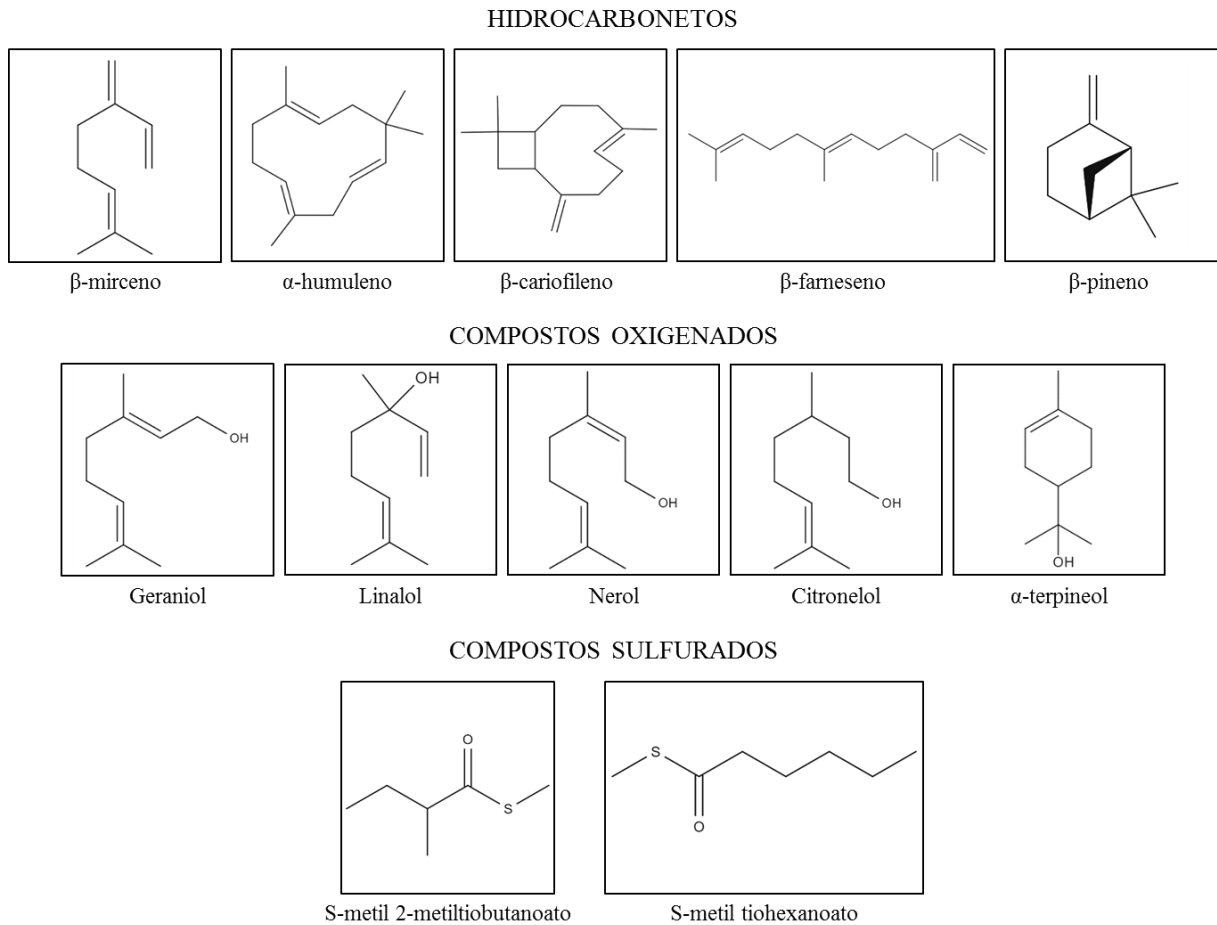
Ainda dentro das resinas duras do lúpulo, outros compostos fenólicos estão presentes em menos concentração. O lúpulo seco contém cerca de 4-14% de compostos fenólicos, os quais fazem parte ácidos fenólicos, chalconas, flavonoides, catequinas e proantocianidinas. Estes compostos podem ser responsáveis pela atividade antioxidante da cerveja e outras propriedades bioativas (PROESTOS & KOMAITIS, 2009).

Alguns estudos de identificação de compostos fenólicos do lúpulo mostraram a presença de luteolina, rutina, ácido ferúlico, catequina (KESKIN et al., 2019), kaempferol, quercetina, ácido gálico e ácido cumárico (ÖNDER, AY & SARKER, 2013). As propriedades funcionais do lúpulo in vitro dependem de diferentes polifenóis. O conteúdo de compostos fenólicos no lúpulo pode variar com a cultivar de lúpulo, com a época e o ano de colheita (INUI et al., 2017).

3.3.3. Óleo Essencial

O lúpulo seco apresenta cerca de 0,5 – 3,0% de óleo essencial em massa que, assim como os ácidos amargos, são produzidos nas glândulas de lupulina (DURELLO, SILVA & BOGUSZ JR, 2019; RETTBERG, BIENDL & GARBE, 2018). Convencionalmente os compostos presentes no óleo essencial do lúpulo estão divididos em hidrocarbonetos, compostos oxigenados e compostos contendo enxofre. A Figura 6 apresenta a estrutura química dos principais compostos presentes no óleo essencial de lúpulo.

Figura 6: Estrutura química de hidrocarbonetos, compostos oxigenados e sulfurados encontrados no óleo essencial de lúpulo.



Fonte: Adaptado de DURELLO, SILVA E BOGUSZ JR. (2019).

A composição química dos óleos de lúpulo depende principalmente da variedade do lúpulo e menos das condições de cultivo, processamento e armazenamento. O perfil característico de cada variedade permite a identificação da cultivar de lúpulo, a determinação da variedade ou diversidade genética e interpretação das propriedades de aromas (KOVÁČEVIČ & KAČ, 2002; YAN et al., 2019).

Os hidrocarbonetos englobam principalmente monoterpenos, como β -mirceno, e sesquiterpenos como α -humuleno, β -cariofileno e β -farneseno. Estes compostos juntos podem representar até 80% da composição do óleo essencial. β -mirceno é considerado o precursor principal do aroma de lúpulo verde, possui um odor descrito como herbáceo, resinoso, verde, balsâmico e de lúpulo fresco (LIGOR et al., 2014; LAFONTAINE et al., 2019).

A oxidação do mirceno dá origem a compostos cíclicos, como α -pineno e β -pineno, e também forma terpenóides como linalol, nerol, geraniol, citral e α -terpineol. Na fermentação durante a fabricação de cerveja ocorrem transformações de composto aromáticos, onde geraniol

é transformado em β -citronelol e linalol, enquanto o linalol e o nerol se isomerizam em α -terpineol (RETTBERG, BIENDL & GARBE, 2018).

Os compostos oxigenados são uma mistura extremamente complexa de álcoois, aldeídos, ácidos, cetonas, epóxidos e ésteres (SHARP & LAWS, 1981). O linalol é um dos componentes mais aromáticos dos óleos essenciais de lúpulo. É um álcool terpeno muito saboroso com odor cítrico e semelhante ao da bergamota (ABERL & COELHAN, 2012). Linalol e geraniol também foram importantes compostos relacionados ao aroma floral dos óleos de lúpulos e da cerveja (EYRES & DUFOUR, 2009). A Tabela 2 apresenta resumidamente os aromas atribuídos aos principais compostos do óleo essencial do lúpulo.

Tabela 2: Características aromáticas de compostos presentes no óleo essencial de lúpulo.

Composto	Descrição
β -Myrceno	herbáceo; resinoso; balsâmico; lúpulo fresco
α -Myrceno	resina; pinho; ervas
α -Humuleno	picante; amadeirado
β -Cariofileno	amadeirado; especiarias; picante
Oxido de Cariofileno	doce, frutado, amadeirado e herbal
β -Farneceno	amadeirado; cítrico doce
α -Pino e β -Pino	pinus
β -Ionona	floral violeta frutado (proveniente da degradação de carotenóides)
β -Damascenona	frutado e mel (proveniente da degradação de carotenóides)
Linalol	notas florais e frutadas; cítrico; bergamota
Geraniol	rosa; gerânio
Nerol	doce; cítrico; rosas
α -Terpinerol	gorduroso; anis; menta
β -Citronelol	limão; lima
Epóxidos de Humuleno	feno; cedro; mofado; artemísia;
S-metil-2-metil tiobutanoato	trufa
S-metil tiohexanoato	abacaxi

Fonte: Adaptado de SHARP & LAWS, (1981); EYRES, MARRIOTT & DUFOUR (2007); RETTEMBERG et al. (2018); DURELLO, SILVA & BOGUSZ JR. (2019).

O termo “aroma de lúpulo nobre” é muitas vezes usado para descrever características herbáceas ou picantes. Essas características tem sido associadas a produtos de oxidação ou hidrólise de sesquiterpenos durante o armazenamento e a fervura do mosto. Os odores de epóxidos de humuleno são descritos como semelhantes a feno, mofado, cedro e artemísia (EYRES, MARRIOTT & DUFOUR, 2007; RETTBERG, BIENDL & GARBE, 2018).

Embora os terpenóides contribuam positivamente para a qualidade aromática da cerveja, alguns compostos que contém enxofre são, na maioria das vezes, responsáveis por conferir

odores indesejáveis e desagradáveis ao produto. Os compostos contendo enxofre incluem organo-sulfurados e tio ésteres que lembram odor de milho cozido, repolho, cebola, queijo, plástico queimado, suor e borracha. Por outro lado, compostos como o tioéster S-metil-2-metil tiobutanoato (aroma de trufa) e o S-metil tiohexanoato (herbal e frutado, lembra abacaxi) podem ser de aromas agradáveis (SHARP & LAWS, 1981; LERMUSIEAU, BULENS & COLLIN, 2001; DURELLO, SILVA & BOGUSZ JR., 2019).

Além das características aromáticas o óleo essencial de lúpulo possui propriedades biológicas como atividade antibacteriana que contribui com a qualidade microbiológica da cerveja. Extratos ou óleos essenciais obtidos de diferentes cultivares de lúpulo demonstram alto potencial antibacteriano para bactérias Gram-positivas e uma atividade leve a moderada contra algumas bactérias Gram-negativas. O óleo de lúpulo altera as propriedades das membranas de bactérias e é ativo contra bactérias patogênicas de plantas, podendo ser empregado até mesmo como pesticida natural (BOCQUET, SAHPAZ & RIVIÈRE, 2018; POŁEĆ et al., 2019).

3.4. Técnicas de Extração de Lúpulo

A extração é um processo de separação presente em vários setores da indústria farmacêutica, alimentícia, química, de perfumaria e cosmética, de biocombustíveis ou de materiais. Além da aplicação industrial, as diversas técnicas de extração são usadas em escala laboratorial no preparo de amostras para análises fitoquímicas, sendo uma das etapas mais importantes do processo (CHEMAT et al., 2020). A escolha da técnica de extração mais adequada para cada situação, deve levar em conta o objetivo da prática e a aplicação do extrato.

A separação de compostos de uma matriz sólida por meio das diferentes técnicas de extração, pode ser compreendida em três etapas: (1) a dessorção local dos solutos e a solubilização no meio extrator; (2) a difusão interna do soluto através da fase sólida até atingir a superfície; (3) e a difusão externa do soluto através da película (DA SILVA, ROCHA-SANTOS & DUARTE, 2016). Por isso o estudo de transferência de massa é fundamental para a compreensão dos mecanismos envolvidos e a influência dos parâmetros operacionais no processo de extração.

A seleção do solvente é baseada na lei de similaridade e intermiscibilidade entre soluto e solvente com a mesma polaridade (semelhante dissolve semelhante), além de fatores como seletividade, custo e segurança. Quanto ao tamanho da partícula, quando menor for o tamanho, maior será a área de contato com o solvente, porém um material muito fino pode prejudicar a extração. Em relação a temperatura, a solubilidade e a difusão aumentam com a elevação da

temperatura, entretanto, temperaturas excessivas podem decompor compostos termolábeis e causar a perda de solvente (ZHANG, LIN & YE, 2018).

Analisando quimicamente, a extração de voláteis e não voláteis do lúpulo para incorporação na cerveja está diretamente relacionada a estrutura química dos compostos alvos. Em uma extração alcoólica, compostos polares, como linalol, são obtidos em grande quantidade, enquanto os hidrocarbonetos apolares, como o mirceno, dificilmente são recuperados (RETTBERG, BIENDL & GARBE, 2018). A Tabela 3 apresenta alguns trabalhos encontrados na literatura que utilizaram diferentes técnicas de extração para obtenção de compostos de lúpulo.

Tabela 3: Trabalhos de extração de Lúpulo realizados por diferentes técnicas convencionais e não convencionais.

Método(s) de Extração	Solvente(s)	Propósito	Referência
Maceração e Soxhlet	Hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol e etanol aquoso a 25%	Compostos Fenólicos	Onder, Ay & Sarker (2013)
Maceração e Soxhlet	Hexano, 2-metiloxolano	Compostos de aroma	Rapinel et al. (2020)
Maceração	Etanol/Água	Compostos Fenólicos	Paunović et al. (2015)
Maceração	Etanol/Água	Compostos antifúngicos	Bocquet et al. (2018)
Maceração	Metanol/Água e Acetona	Compostos Bioativos	Forino et al. (2016)
Maceração	Água e Etanol	Compostos antioxidantes	Liu et al. (2007)
Maceração	Água, Metanol/Água, Etanol/Água	Compostos antioxidantes	Kowalczyk et al. (2013)
Maceração	Água e Etanol/Água	Compostos Bioativos	Kobus-Cisowska et al. (2019)
Maceração	Etanol/Água	Ácidos Amargos	Negri, Di Santi & Tabach (2010)
Maceração e EAU	Metanol	Compostos Fenólicos	Keskin et al. (2019)
Maceração e Hidrodestilação	Éter de Petróleo, Diclorometano e Metanol	Oleo essencial, α - e β -ácidos e Polifenóis	Santagostini et al. (2020)
Maceração, Refluxo Térmico, EAU e EAM	Metanol e Ácido Fórmico	Prenilflavonóides e ácidos amargos	Prencipe et al. (2014)
Hidrodestilação	Arraste a vapor	Óleo Essencial	Iglesias et al. (2020)
Hidrodestilação	Arraste a vapor	Óleo essencial	Bedini et al. (2016)
Hidrodestilação	Arraste a vapor	Óleo Essencial	Yan et al. (2019)
Hidrodestilação	Arraste a vapor	Óleo essencial	Forteschi et al. (2019)
Hidrodestilação	Arraste a vapor	Óleo essencial	Pistelli et al. (2018)
Hidrodestilação Assistida por Microondas	Arraste a vapor	Óleo Essencial	Tyskiewicz et al. (2018)

EAU	Solvente eutético profundo composto de Glicerol e L-alanina	Compostos Fenólicos	Lakka et al. (2019)
EAU	Etanol/Água	Compostos Bioativos	Almeida et al. (2019)
EAU	Metanol, Etanol e Isopropanol e suas soluções aquosas	Compostos antioxidantes	Muzykiewicz et al. (2019)
EAU e EAM	Água, Etanol/Água, Etanol	Compostos Bioativos	Carbone et al. (2020)
ELP	Metanol, Acetona, Etanol, Isopropanol, Éter de Petróleo, Éter Dietílico, Metanol/Éter Dietílico	Ácidos Amargos	Čulík et al. (2009)
EFS	CO ₂	Compostos Flavonoides	Guo-Qing et al. (2005)
EFS e Soxhlet	Fluido Supercrítico: CO ₂ Soxhlet: Hexano	Compostos de aroma e amargor	Zeković, Pfaf-Šovljanski & Grujić (2007)
EFS e ELP	CO ₂ , CO ₂ + Etanol, Etanol	α- e β-ácidos	Formato et al. (2013)
EFS e Soxhlet	Fluido Supercrítico: CO ₂ Soxhlet: Hexano	Compostos Antimicrobianos	Rój et al. (2015)
EFS	CO ₂	Óleo resina e α-ácidos	del Valle et al. (2003)
Fluidos pressurizados e Soxhlet	Fluidos Pressurizados: CO ₂ supercrítico, propano, CO ₂ + co-solventes Soxhlet: Etanol, acetato de etila, metanol e hexano	Compostos fenólicos e flavonoides	Veiga et al. (2021)
Fluidos Pressurizados	CO ₂ líquido e Etanol	Resinas, α- e β-ácidos, óleo	Daoudand & Kusinski (1992)

EAU – Extração ssistida por Ultrassom; EAM – Extração assistida por Micro-ondas; ELP – Extração com líquido pressurizado; EFS – Extração com Fluido Supercrítico.

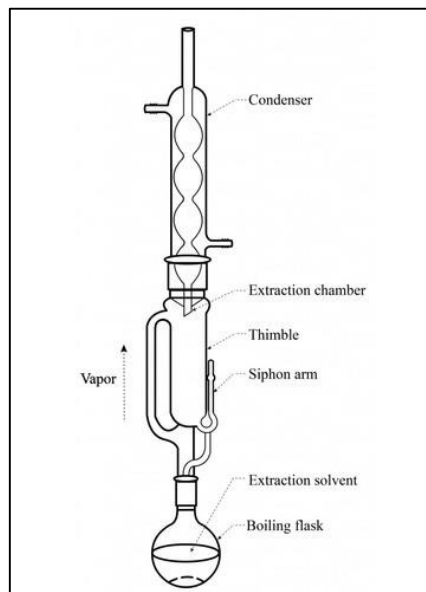
Os métodos tradicionais de extração envolvem algumas problemáticas como longos tempos de extração, grande quantidade de solventes orgânicos de custo elevado, e a geração de resíduos prejudiciais ao meio ambiente e a saúde humana. Além disso, o extrato obtido geralmente necessita de purificação e concentração antes da aplicação ou análise (MUSTAFA & TURNER, 2011).

Dentre as técnicas convencionais de extração comumente empregadas na obtenção de compostos bioativos e óleos essenciais podemos mencionar a extração por Soxhlet, maceração e hidrodestilação. As técnicas não convencionais vem sendo desenvolvidas para superar as limitações encontradas nas técnicas convencionais e são elas: extração assistida por ultrassom, assistida por campo elétrico pulsado, assistida por enzima, assistida por micro-ondas e extração com fluidos pressurizados (AZMIR et al., 2013).

3.4.1. Soxhlet

O extrator de Soxhlet (Figura 7) criado por Franz Von Soxhlet consiste num “dedal” onde é adicionado o material vegetal, o qual é conectado a um balão contendo o solvente e um condensador com água corrente para resfriamento. O solvente é aquecido para vaporização, condensa e cai sobre a amostra. Através de um sifão, o solvente volta para o frasco de aquecimento e o processo se repete até alcançar a extração completa (ADADI, BARAKOVA & KRIVOSHAPKINA, 2018).

Figura 7: Aparelho tradicional de extração Soxhlet.



Fonte: AZWANIDA, 2015.

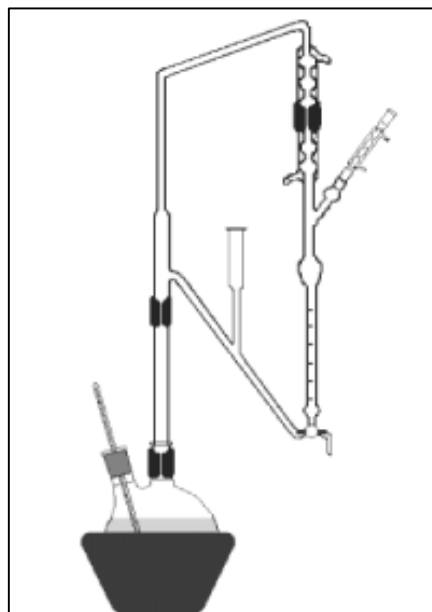
3.4.2. Maceração

A extração por maceração é uma técnica barata e popular de obtenção de compostos bioativos e óleos essenciais de plantas. O processo consiste em adicionar a matéria prima (grosseira ou moída) em um recipiente contendo solvente onde permanece durante um período de tempo suficiente para o rompimento da parede celular e a liberação dos fitoquímicos. Em seguida a mistura é filtrada e o bagaço, que é o resíduo sólido, é prensado. O processo pode ser agitado ocasionando o aumento da difusão e a renovação do solvente na superfície da amostra para melhorar a eficiência de extração (AZMIR et al., 2013; AZWANIDA, 2015).

3.4.3. Hidrodestilação

A destilação ou hidrodestilação é a maneira tradicional de isolar compostos voláteis, como os óleos essenciais de materiais vegetais. Geralmente em escala laboratorial é utilizado um aparelho do tipo Clevenger (Figura 8). O processo consiste na evaporação dos compostos voláteis da matriz vegetal utilizando vapor que em seguida são condensados e coletados (GAVAHIAN & FARAHNAKY, 2018).

Figura 8: Aparelho para hidrodestilação tipo Clevenger.



Fonte: SILVA, 2003.

Dependendo como ocorre o contato entre a água e a matriz podem ser determinados três tipos de destilação: hidrodestilação; destilação a vapor; e destilação água/vapor. Na hidrodestilação o material vegetal fica em contato direto com a água fervente. Na destilação a vapor, o vapor é produzido em uma caldeira e conduzido através de tubulações até o recipiente contendo a matéria prima. O vapor está sempre saturado, úmido e nunca superaquecido, e o material está apenas em contato com o vapor e não com a água fervente. A destilação água/vapor é semelhante a anterior, porém o vapor é gerado no fundo do recipiente abaixo da bandeja perfurada (REYES-JURADO et al., 2015).

3.4.4. Extração Assistida por Ultrassom (EAU)

O ultrassom foi definido como as frequências superiores a 20 kHz, geralmente produzidas por um corpo vibratório que faz o meio circundante vibrar, transferindo energia para as partículas vizinhas. Os principais parâmetros que influenciam nos processos de ultrassom são a potência, frequência e amplitude, enquanto o nível de energia que se propaga pode ser expresso em potência do ultrassom (W), intensidade do ultrassom (W/cm^2) ou densidade de energia acústica (W/cm^3) (WEN et al., 2018).

A transferência de energia pelas ondas de ultrassom causa a oscilação das partículas no meio em várias direções (ondas longitudinais e ondas transversais). As ondas longitudinais de ultrassom causam o efeito de cavitação, que é a compressão e a refração das partículas do meio e seu subsequente colapso (GALLO, FERRARA & NAVIGLIO, 2018). Em um meio líquido, a cavitação causada pela propagação das ondas do ultrassom provoca a formação, o crescimento e a implosão de bolhas. Quando essas bolhas atingem um tamanho crítico, ela entram em colapso durante o ciclo de compressão, o que gera condições locais extremas, atingindo temperaturas de aproximadamente 5000K e pressões estimadas de 50-1000 atm (CHEMAT et al., 2017).

Nos processos de extração a energia do ultrassom auxilia na lixiviação de compostos orgânicos e inorgânicos da matriz vegetal. O mecanismo provável é que o ultrassom facilita o acesso do solvente ao material vegetal, intensificando a transferência de massa. Em um primeiro momento ocorre a difusão através da parede celular, em seguida a lavagem do conteúdo intracelular (AZMIR et al., 2013).

3.4.5. Extração Assistida por Campo Elétrico Pulsado

A técnica de campo elétrico pulsado envolve a aplicação de pulsos de alta tensão por apenas alguns micro ou milissegundos no material que é mantido entre dois eletrodos. O campo elétrico é aplicado de diferentes formas, como ondas de decadência exponencial, ondas bipolares ou pulsos oscilatórios. O princípio envolvido por trás dos processos utilizado campos elétricos pulsados é que a presença de íons fornece um nível de condutividade elétrica ao material (SYED et al., 2017).

Na extração assistida por campo elétrico pulsado, o intuito é realizar um pré-tratamento para causar a ruptura da membrana celular da matriz vegetal. Durante a suspensão de células vivas no campo elétrico, um potencial elétrico passa através da membrana celular aumenta as cargas na interface da membrana e separa as moléculas da membrana celular. Quando o potencial atinge um valor crítico (0,2-1,0 V), ocorre a formação de poros na membrana celular causando um aumento de permeabilidade do solvente. (YAN, HE & XI, 2017).

A utilização de campos elétricos pulsado foi investigada primeiramente para preservação de alimentos, devido sua eficiência na inativação de microrganismos patogênicos. Contudo, essa tecnologia teve algumas limitações, como a resistência de esporos de bacterianos e de ascósporos de fungos. Ainda assim a técnica é uma ferramenta eficaz para aumentar a eficiência de secagem e melhorar o rendimento de extração de materiais intracelulares (WANG et al. 2018).

Os efeitos do tratamento dependem principalmente da intensidade do campo elétrico e do tempo de duração (número de pulsos e largura do pulso aplicado em um lote), que podem formar poros grandes e irreversíveis. A força do campo elétrico crítico para causar permeabilidade na membrana depende do tamanho e da geometria da célula. De modo geral é necessário uma intensidade de 1-2 kV/cm para células vegetais (tamanho de 40-200 μ m) e na faixa de 12-20 kV/cm para microrganismos (tamanho de 1-10 μ m) (SOLIVA-FORTUNY et al., 2009).

3.4.6. Extração Assistida por Enzima

Alguns compostos nas matrizes vegetais são encontrados no citoplasma celular ou ainda retidos na rede de polissacarídeo-lignina por ligações de hidrogênio ou hidrofóbicas, o que não permite o acesso do solvente. A adição de enzimas específicas, como celulases, α -amilases e

pectinases, promove a quebra da parede celular e a hidrólise de polissacarídeos e corpos lipídicos, facilitando a extração (AZMIR et al., 2013).

O princípio da extração assistida por enzimas é a capacidade das enzimas catalisarem reações com especificidade, alta seletividade e capacidade de operar em condições suaves em solução aquosa. Para ter eficiência no uso de enzimas é importante entender as propriedades catalíticas e o mecanismo de ação, as condições operacionais ideais e qual enzima é mais apropriada para o material selecionado (PURI, SHARMA & BARROW, 2012).

O emprego de enzimas em processos de extração consiste em um pré-tratamento para liberar compostos limitados e aumentar o rendimento geral. Os parâmetros operacionais que influenciam nas extrações com enzimas são a temperatura de reação, tempo, pH do sistema, concentração de enzima e tamanho da partícula do substrato (NADAR, RAO & RATHOD, 2018).

3.4.7. Extração Assistida por Micro-ondas (EAM)

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas compostas por campos elétricos e campos eletromagnéticos que oscilam perpendicularmente um ao outro em frequências entre 300 Mhz e 300 GHz. Estas ondas podem penetrar em materiais e interagir com componentes polares para gerar calor. O aquecimento se dá pela condução iônica e rotação dipolo, portanto, apenas alguns materiais podem ser aquecidos, com base em sua constante dielétrica (CHAN et al., 2011).

O mecanismo da extração assistida por micro-ondas pode ser descrito em etapas: a primeira envolve a desorção de solutos dos locais ativos da matriz da amostra; ocorre a difusão do solvente de extração na matriz; em seguida os solutos da matriz são liberados para o solvente. A eficiência da extração com micro-ondas é atribuída a melhora na solubilidade e efeitos de transferência de massa e na interrupção no equilíbrio de superfície (ALUPULUI, CALINESCU & LAVRIC, 2012).

O solvente é o principal fator no processo de extração assistido por micro-ondas. Quanto maior for sua constante dielétrica e a perda dielétrica, maior é a capacidade do solvente de absorver energia de micro-ondas, levando a uma taxa de aquecimento do solvente mais rápida em relação ao material vegetal. Além do solvente, o tempo de aplicação, nível de potência, temperatura e área de superfície de contato também são fatores que afetam a eficiência de extração assistida por micro-ondas (ROUTRAY & ORSAT, 2011).

3.4.8. Extração com Líquido Pressurizado (ELP)

A extração líquida pressurizada é uma técnica que utiliza solventes em pressões elevadas podendo ser auxiliada pelo aumento da temperatura. O emprego de alta pressão mantém o solvente abaixo do seu ponto de ebulição. A temperatura elevada aumenta a solubilidade dos analitos, promove a quebra das interações matriz-analito e eleva a taxa de difusão. Além disso, pressões e temperaturas altas reduzem a viscosidade e a tensão superficial do solvente, o que favorece a penetração nos poros da matriz, facilitando a extração dos compostos ou dos analitos de interesse (VAZQUEZ-ROIG & PICÓ, 2015).

Inicialmente a aplicação da técnica ELP foi concentrada na extração de poluentes ambientais, em matrizes de solos, sedimentos e lodo de esgotos. A principal vantagem que fez a ELP se difundir foi a redução significativa do consumo de solvente e do tempo de extração. Esses fatores despertaram o interesse de outras áreas, incluindo a indústria alimentícia e farmacêutica (CARABIAS-MARTÍNEZ et al., 2005; ANDREU & PICÓ, 2019).

A ELP pode ser realizada de modo estático (descontínuo), dinâmico (contínuo), ou ainda os dos modos associados. No modo estático a célula de extração que contém a amostra é preenchida de solvente e mantida por um determinado tempo na pressão e temperatura selecionadas. Posteriormente o solvente contendo os compostos alvo é coletado em um frasco. No modo dinâmico o solvente é continuamente bombeado a uma taxa de fluxo constante (geralmente 0,3 – 2,5 mL/min) por um tempo determinado (RAMOS, KRISTENSON & BRINKMAN, 2002).

No modo de extração estática, os principais fatores são a pressão e a temperatura de trabalho, onde a eficiência da extração depende da solubilidade dos compostos no solvente extrator. Uma desvantagem do modo estático é a extração incompleta devido a quantidade limitada do fluido de extração, o que pode ser contornado pela realização de mais ciclos de extração (MUSTAFA & TURNER, 2011).

A renovação do solvente no modo de extração dinâmica, faz com que não ocorra a saturação do solvente na superfície da amostra. Considerando o uso de temperaturas e pressões elevadas, segundo a lei da difusão de Fick, as taxas de transferência de massa são aceleradas, aumentando a eficiência da extração e reduzindo o tempo do processo (BAUTZ, POLZER & STIEGLITZ, 1998).

A ELP permite a obtenção de uma série de compostos, polares e não polares. Os parâmetros que influenciam o processo são o tipo de solvente, tempo estático e dinâmico, fluxo de solvente, temperatura e pressão de operação, tamanho de partícula e teor de umidade da

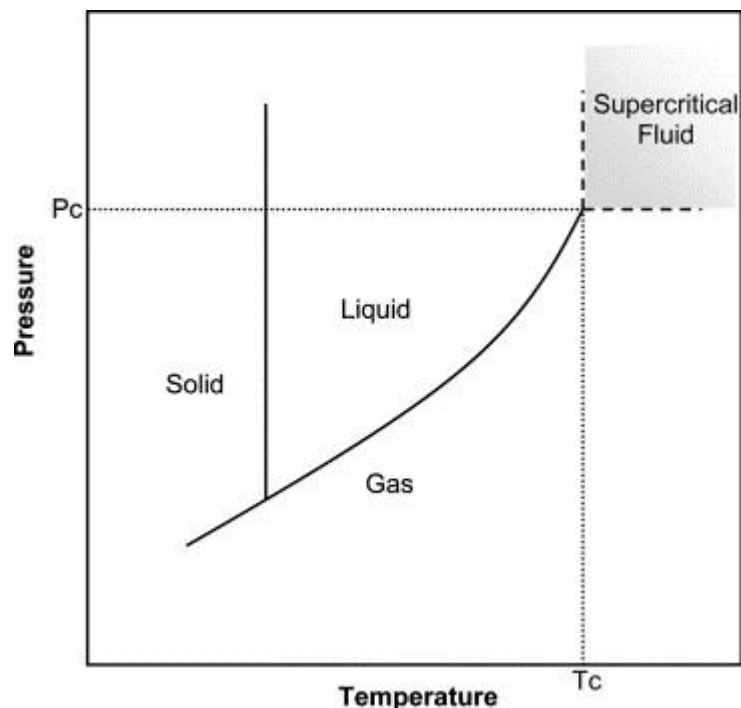
amostra. Em matrizes complexas ou quando há fortes interações dos compostos com a matriz, o simples aumento da temperatura e a redução do tamanho das partículas tende a melhorar a eficiência da extração (MUSTAFA & TURNER, 2011; AZMIR et al., 2013).

Um fator interessante da técnica ELP é a flexibilidade no uso de solventes, sendo água, metanol, etanol, acetato de etila e a mistura destes os mais comuns. Pela possibilidade de utilizar solventes com diferentes polaridades, essa técnica permite extrair uma grande variedade de compostos, desde muito polares (como açúcares ou proteínas) até compostos médios/apolares (como carotenoides e lipídeos) (GALLEGO, BUENO & HERRERO, 2019).

3.4.9. Extração com Fluido Supercrítico/Subcrítico (EFS)

Um fluido supercrítico é o estado de uma determinada substância submetida a condições de temperatura e pressão acima do seu ponto crítico (Figura 9). O ponto crítico é definido como a temperatura (T_C) e pressão (P_C) onde acima destas condições não há distinção entre as fases líquida e gasosa. Nessas condições, a densidade do fluido permanece semelhante à de um líquido, enquanto a viscosidade, a tensão superficial e a difusividade são semelhantes à de um gás (HERRERO, CIFUENTES & IBAÑEZ 2006; AZMIR et al., 2013).

Figura 9: Diagrama de fases típico de uma substância pura.



Fonte: HERRERO, CIFUENTES & IBAÑEZ (2006).

O interessante dos fluidos supercríticos é a possibilidade de modificar estas características físico-químicas através da variação da pressão e/ou temperatura, o que conseqüentemente influencia nas propriedades de solubilidade e solvatação (DA SILVA, ROCHA-SANTOS & DUARTE, 2016).

A eficiência da extração utilizando fluidos supercríticos é baseada nestas propriedades e portanto depende do ajuste de alguns parâmetros que tornam a técnica mais seletiva e específica em comparação aos métodos tradicionais. Os fatores que influenciam nos processos de extração utilizando fluidos supercríticos são a escolha do solvente, temperatura, pressão, tempo de extração, taxa de fluxo de solvente, tamanho de partícula da amostra e uso de co-solventes (SHARIF et al., 2014; GALLEGO, BUENO & HERRERO, 2019).

Dentre os solventes utilizados na EFS (Tabela 4), o dióxido de carbono (CO₂) é o mais popular devido sua temperatura e pressão crítica moderada e por não deixar resíduos no extrato final, obtendo um produto livre de solvente. Além disso, o CO₂ é um gás inerte, atóxico, não inflamável, disponível em alta pureza por um custo razoável e que pode ser reciclado (GANDHI, ARORA & KUMAR, 2017). No entanto, uma limitação do CO₂ é a sua baixa polaridade, o que o torna menos eficaz na extração de compostos com maior polaridade. Para contornar este problema, podem ser utilizados agentes polares em pequenas quantidades, conhecidos como modificadores ou co-solventes (HERRERO, CIFUENTES & IBAÑEZ 2006).

Tabela 4: Características de solventes utilizados na EFS.

Solvente	T _C (°C)	P _C (MPa)	Densidade (g/mL)	Parâmetro de solubilidade (cal ^{-1/2} .cm ^{-3/2})
Dióxido de Carbono	31,2	7,38	0,470	7,5
Etano	32,4	4,88	0,200	5,8
Eteno	10,1	5,11	0,200	5,8
Metanol	-34,4	8,09	0,272	8,9
Óxido Nitroso	36,7	7,26	0,460	7,2
n-Buteno	-139,9	3,64	0,221	5,2
n-Pentano	-76,5	3,37	0,237	5,1
Hexafluoreto de Enxofre	45,8	3,82	0,730	5,5
Água	101,1	22,05	0,322	13,5

Fonte: Adaptado de DA SILVA, ROCHA-SANTOS & DUARTE (2016).

Alguns autores utilizam os termos fluido subcrítico (HERRERO, CIFUENTES & IBAÑEZ, 2006), CO₂ líquido (DAOUD & KUSINSKI, 1993) ou ainda CO₂ denso (KERROLA, 1995) para se referir a extrações empregando dióxido de carbono abaixo do ponto

crítico, mas trata-se apenas de uma questão de terminologia, onde o que varia são apenas as condições.

A seletividade e o poder do solvente dependem da densidade, que pode ser variada controlando a pressão e a temperatura. Em condições de temperatura abaixo do ponto crítico, o CO₂ pode ser liquefeito aumentando a pressão. Sob altas pressões os gases possuem densidades semelhantes às dos líquidos, atuando de forma semelhante a qualquer solvente orgânico. Em geral, o poder solvente aumenta a pressão constante com o aumento da densidade, e a densidade constante, com o aumento da temperatura (KERROLA, 1995).

A água também tem sido utilizada como solvente em sistemas pressurizados de extração. A água subcrítica é definida como água quente, em temperaturas entre 100 °C (temperatura de ebulição da água) e 374 °C (temperatura crítica da água), a pressão suficiente para manter o estado líquido. Na extração com água subcrítica, a constante dielétrica, a viscosidade e a tensão superficial diminuem e a difusividade é melhorada, além disso a transferência de massa ocorre através do processo de difusão e convecção (ZHANG et al., 2020).

3.5. Estado da Arte

O lúpulo é uma planta de grande importância na indústria cervejeira por contribuir com as características de aroma e amargor do produto. Os compostos de interesse presentes no lúpulo são os ácidos orgânicos amargos, os polifenóis e os óleos essenciais. Estes compostos além dos aspectos sensoriais muitas vezes possuem propriedades bioativas, como a capacidade de inibir radicais livres ou ainda microrganismos deteriorantes e patogênicos em alimentos.

A extração de compostos do lúpulo pode ser realizada por meio de diferentes técnicas. A hidrodestilação permite recuperar os óleos essenciais, enquanto a extração empregando dióxido de carbono no estado subcrítico, operando em baixas condições de temperatura, pode ser uma alternativa para obtenção de extratos de lúpulo contendo óleos essenciais e outros compostos com propriedades bioativas.

O óleo essencial de lúpulo, bem como os extratos possuem alto valor agregado devido as propriedades que possuem, portanto a extração em sistema pressurizado empregando o CO₂ subcrítico é viável pois geralmente os extratos obtidos são de maior qualidade e livres de solventes orgânicos. Este trabalho teve por finalidade estudar extratos de lúpulo contendo óleo essencial, obtidos por hidrodestilação e utilizando CO₂ subcrítico, visando a aplicação na indústria cervejeira.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Matéria Prima

Neste trabalho foram utilizados lúpulos comerciais das variedades El-dorado, Polaris, Hallertau-Blanc e Callista, cedidos gentilmente pela Cervejaria Ágape (Barão de Cotegipe - RS) no formato de pellets. Os lúpulos foram recebidos e armazenados sob refrigeração a -20 °C. O teor de umidade das amostras de lúpulo, apresentado na Tabela 5, foi determinado pelo método de secagem em estufa a 105 °C por 6 horas (IAL, 2008).

Tabela 5: Características das variedades de lúpulo utilizadas para extração.

Lúpulo	País de Origem	Marca	Umidade (%)
El dorado	EUA	Agrária*	11,46 ± 0,24
Polaris	Alemanha	HVG	11,43 ± 0,16
H-Blanc	Alemanha	HVG	11,18 ± 0,16
Callista	Alemanha	HVG	10,63 ± 0,04

Fonte: O Autor (2021). *Importado por Agrária.

4.2. Hidrodestilação

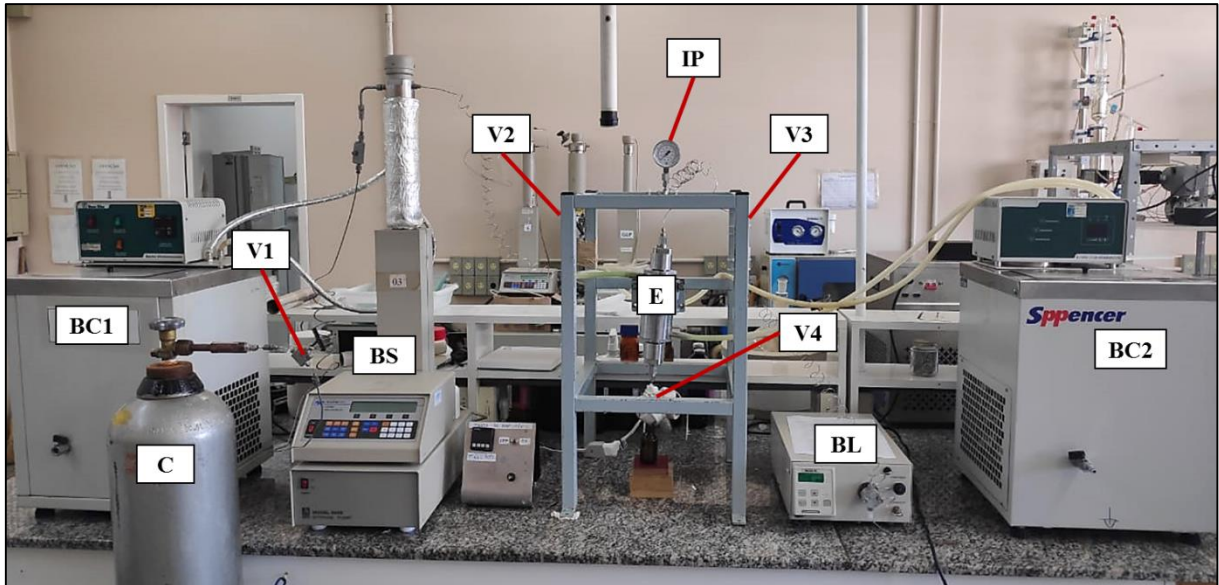
A extração por hidrodestilação foi realizada utilizando um aparelho do tipo Clevenger conectado a um balão de 5 L onde foram adicionados 100 g de amostra previamente triturada e 2,5 L de água destilada (1:25). A extração foi realizada a aproximadamente 97 °C durante duas horas e posteriormente o óleo foi coletado, separado da fração aquosa e armazenado sob refrigeração a -20 °C até o momento das análises.

4.3. Extração com fluido pressurizado

A Figura 10 apresenta a unidade de extração com fluido pressurizados. O equipamento é composto por uma bomba seringa (BS), uma bomba de líquido (BL), dois banho de circulação, (BC1) para controle de temperatura da bomba seringa, e (BC2) para controle da temperatura do extrator (E). A válvula (V1) é utilizada para alimentação da bomba seringa com o gás armazenado no cilindro (C), a válvula (V2) para alimentação do extrator quando utilizado sistema gasoso, a válvula (V3) para alimentação do extrator quando utilizado sistema líquido e a válvula (V4) para coleta dos extratos na saída do sistema. Um indicador de pressão (IP) é

utilizado para monitorar a pressão da linha e uma manta de aquecimento foi empregada na válvula (V4) com a finalidade de evitar o congelamento e a obstrução da válvula durante a expansão do CO₂.

Figura 10: Unidade de extração com fluidos pressurizados.



Fonte: O Autor (2021).

Para as extrações com fluido pressurizado, foram inseridas 15 g de amostra de lúpulo em um extrator encamisado, com capacidade volumétrica de 75 mL, o qual foi fechado e conectado a unidade de extração. A alimentação do extrator com solvente foi realizada nas condições de trabalho. O sistema atinge a temperatura e pressão determinada e permanece estático por 30 minutos. Após o tempo de extração estática, a válvula de saída é aberta e a bomba seringa desloca o solvente para o extrator.

As extrações de lúpulo foram realizadas empregando CO₂ no estado subcrítico como solvente, na temperatura de 7 °C e pressão de 100 bar ($\rho = 0,9374$), baseadas em Gardner (1993). Nestas condições, a quantidade de CO₂ alimentado no extrator é de aproximadamente 75g (80 mL), razão de 1:5 para massa de amostra, e o fluxo aproximado é de 1,7 mL/min (1,6 g CO₂/min). Para construção das curvas cinéticas de extração os extratos foram coletados em frascos previamente pesados nos tempos 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100, 120 e 150 minutos. Os extratos utilizados para análise foram coletados e suspensos em etanol 99.3% (Química Moderna) na concentração de 50 mg/mL e armazenados sob refrigeração a 5 °C até o momento das análises.

4.4. Caracterização Química por CG-EM

Os óleos essenciais de lúpulo obtidos pela técnica de hidrodestilação foram analisados por cromatografia gasosa e espectroscopia de massas na Universidade Federal Fronteira Sul (UFFS) em Erechim - RS. Foi utilizado um cromatógrafo GCMS – QP2010 (Ultra, Shimadzu) equipado com uma coluna capilar NST 05ms (Nano Separation Technologies, SP, Brasil) (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm). Hélio foi usado como gás portador a uma vazão de 1,8 ml/min e pressão de 100 kPa. A programação de temperatura do forno foi a seguinte: 40 °C por 3 min; aumento de 10 °C/min até 150 °C; aumento de 3 °C/min até 180 °C; e aumento de 10 °C/min até 210 °C. A temperatura de injeção foi de 220 °C. Foi injetado 1 µL das amostras de óleo essencial, previamente diluídas em diclorometano (Química Moderna), usando uma taxa de divisão de fluxo de 1:10. O espectrômetro de massa foi operado no modo de aquisição *Scan* onde as seguintes condições foram usadas: temperatura de interface e captura de íons de 250 °C, corrente de emissão e energia de ionização de 60 µA e 70 eV respectivamente, e faixa de varredura de 40 – 800 m/z.

4.5. Teor de Compostos Fenólicos Totais

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos de lúpulo obtidos com CO₂ subcrítico foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu conforme descrito por Zaidan et al. (2019), utilizando o ácido gálico como padrão de referência. Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,5 mL de extrato previamente diluído (1 mg/mL); 3,75 mL de água destilada; e 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Os tubos foram agitados e após 5 minutos foram adicionados 0,5 mL de Na₂CO₃ (5%). A mistura foi incubada na ausência de luz por 2 h em seguida foi filtrada em membrana PVDF Simple Pure 0,45 µm e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (LS-7052-BIV, Logen Scientific) a 760 nm.

As análises foram realizadas em triplicata e o teor de compostos fenólicos foi determinado por regressão linear a partir de uma curva padrão ($Abs = 0.0046C - 0.0258$, $R^2=0.9937$) utilizando ácido gálico em concentrações de 5 a 150 µg/mL. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes a ácido gálico por grama de extrato seco (mgEAG/g).

4.6. Determinação de Flavonoides

O teor de flavonoides dos extratos de lúpulo obtidos com CO₂ subcrítico foi determinado conforme Garrido, Ortiz e Pozo (2013) com adaptações, utilizando a quercetina como padrão de referência. Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,5 mL de extrato previamente diluído (1 mg/mL); 4,3 mL de etanol 70% (v/v); 0,1 mL de nitrato de alumínio 10% (m/v); e 0,1 mL de acetato de potássio 10% (m/v). Os tubos foram agitados e armazenados na ausência de luz por 40 min. Em seguida realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (LS-7052-BIV, Logen Scientific) a 415 nm.

As análises foram realizadas em triplicata, e o teor de flavonoides foi determinado por regressão linear a partir de uma curva padrão ($Abs = 0.0054C - 0.0189$, $R^2=0.9991$) utilizando quercetina em concentrações de 0 a 200 µg/mL. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes a quercetina por grama de extrato seco (mgEQ/g).

4.7. Atividade Antioxidante (DPPH)

A determinação da atividade antioxidante seguiu a metodologia de Brand-Willians, Culiver & Berset (1995), baseada na captura do radical livre DPPH (2,2 diphenil1-1-picrylhidrazil). Os óleos essenciais e extratos foram diluídos em etanol 99,3% (Química Moderna) em concentrações de 30 a 0,0025 mg/mL. Foram incubados 1 mL de cada diluição dos óleos ou extratos com 1 mL da solução alcóolica de DPPH 0,1 mM por 30 minutos na ausência de luz. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (LS-7052-BIV, Logen Scientific) a 515 nm, e a atividade antioxidante foi calculada pela equação (Eq.1):

$$\text{Redução DPPH (\%)} = 100 - \frac{(A_A - A_B)}{A_C} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

onde A_A é a absorbância da amostra; A_B é a absorbância do branco (somente etanol); e A_C é a absorbância controle (etanol + DPPH). A atividade antioxidante foi expressa em CI₅₀, calculada por regressão linear, que representa a concentração necessária para capturar 50% do radical livre DPPH.

4.8. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi analisada pelo método de difusão em discos descrito por Arsene et al. (2015) com adaptações. Primeiramente, placas preparadas com meio Ágar Luria Bertani (10 g/L triptona; 5 g/L extrato de levedura; 10 g/L NaCl; 15 g/L ágar ágar) foram inoculadas em superfície com 100 µL das culturas bacterianas contendo aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC/mL. As placas foram deixadas secar por 15 minutos, em seguida foram colocados discos de papel filtro de 10 mm, impregnados com óleo essencial ou com os extratos de lúpulo. As placas foram incubadas à 37 ± 2 °C por 24 horas. Após este período foi verificado a presença ou ausência de halos de inibição.

Para análise dos óleos foram preparados três discos contendo 5, 10 e 20 µL do óleo essencial de cada variedade de lúpulo, enquanto para os extratos foram preparados três discos, cada um com 20 µL do extrato de lúpulo diluído em diclorometano na concentração de 50 mg/mL. Um disco sem óleo ou extrato também foi adicionado às placas como controle negativo. As bactérias testadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708).

4.9. Análise Estatística

O tratamento estatístico dos dados foi realizado utilizando o software Statística 5.0 (StatSoft, Tulsa, EUA), onde o nível de significância estabelecido foi de 95% ($p < 0,05$). Foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida da comparação de médias pelo teste de Tukey. Os resultados estão expressos na forma de média \pm desvio padrão, sendo que as análises de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos foram realizadas em triplicata.

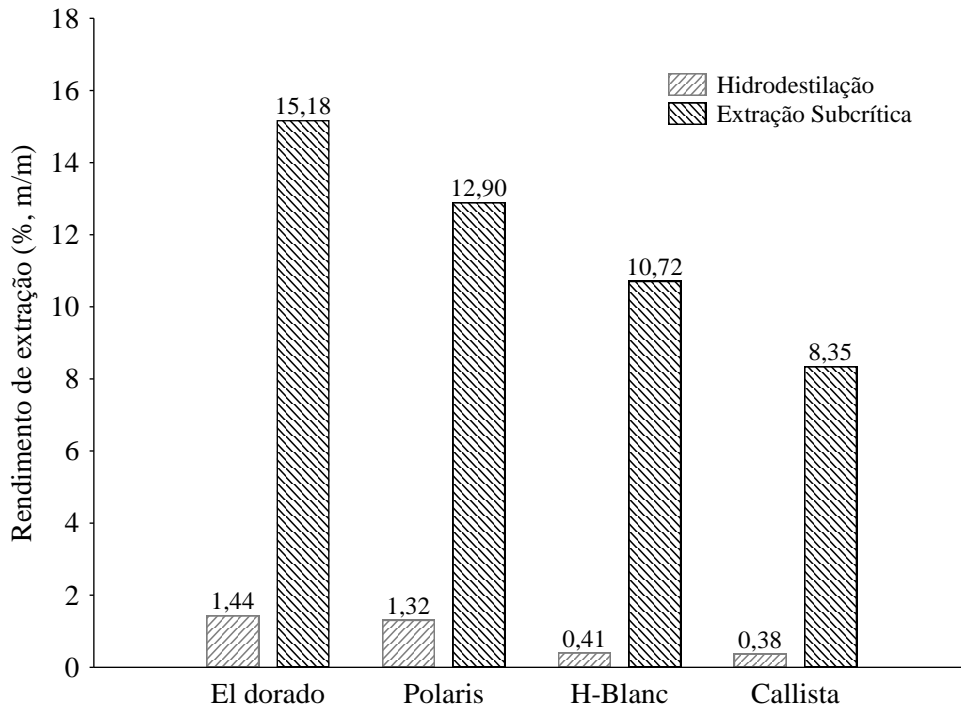
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Óleo essencial e extratos de lúpulo

A Figura 11 apresenta o rendimento global de óleo essencial e extratos de lúpulo das diferentes variedades estudadas, obtidos por hidrodestilação e extração com CO₂ subcrítico. Os lúpulos El dorado e Polaris possuem um alto teor de óleo essencial, 1,44 e 1,32% em massa respectivamente, enquanto H-Blanc e Callista, demonstraram rendimento um pouco menor, de 0,41 e 0,38% (m/m) respectivamente.

Para extração com CO₂ subcrítico, os rendimentos de extração foram consideravelmente maiores do que por hidrodestilação. A tendência em relação a variedade de lúpulo foi a mesma. A variedade El dorado apresentou o maior rendimento de 15,18%, seguido das variedades Polaris, H-Blanc e Callista com 12,90; 10,72 e 8,35% respectivamente. Cabe ressaltar que estas variedades de lúpulo são consideradas de aroma, devido ao baixo teor de α -ácidos.

Figura 11: Rendimento global de extração de lúpulo por hidrodestilação e extração subcrítica.

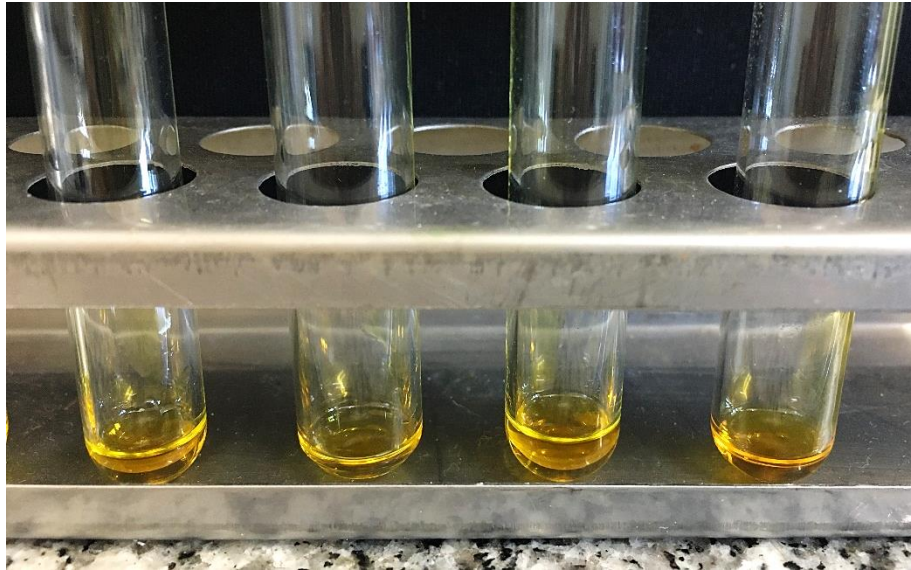


Fonte: O Autor (2021).

A Figura 12 mostra a aparência dos extratos obtidos em diferentes tempos para a construção das curvas cinéticas. Os extratos apresentam coloração amarela clara e aspecto

viscoso. Além do óleo de lúpulo que é miscível em CO₂ líquido, outras resinas possivelmente são extraídas juntamente com o óleo, o que justifica os maiores rendimentos observados por esta técnica de extração.

Figura 12: Aspecto visual do extrato de lúpulo (Polaris) obtidos por extração pressurizada com CO₂ subcrítico.



Fonte: O Autor (2021).

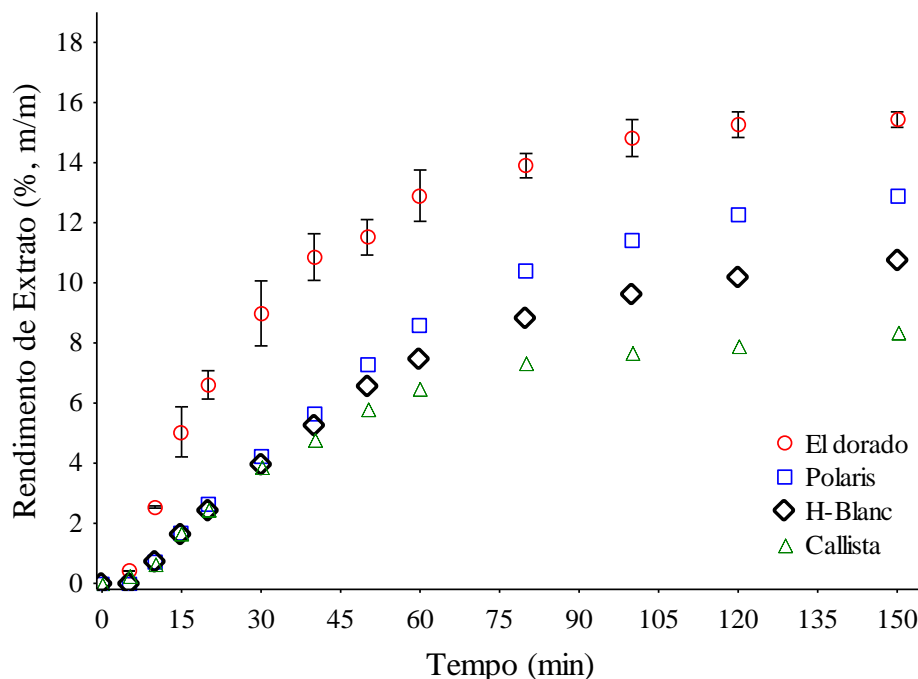
Formato et al. (2013) relatou rendimentos de 2,3 e 2,4% (m/m) após 100 minutos de extração com CO₂ supercrítico e CO₂ + etanol respectivamente, nas condições de 350 bar e 35 °C. Os resultados não se assemelham com os rendimentos obtidos utilizando CO₂ subcrítico. Além das diferentes condições de extração, é de conhecimento que os teores de α e β -ácidos e de óleo essencial são características particulares de cada variedade de lúpulo e podem variar de acordo com o local e a época de colheita.

São vários os fatores que influenciam o processo de extração em sistemas pressurizados, contudo podemos dizer que as condições de pressão e temperatura governam a qualidade e a seletividade dos compostos alvos. Estes dois parâmetros estão diretamente ligados as propriedades termodinâmicas do solvente (densidade, solubilidade), de transferência de massa (viscosidade, difusividade), entre outros (PAVLÍČ et al., 2020). Compostos mais leves, como os óleos essenciais são extraídos em condições mais amenas de pressão e temperatura, e o incremento destes parâmetros implica na extração de compostos mais pesados, como ceras e resinas (PEREIRA E MEIRELES, 2010).

No estudo de extração com fluido supercrítico de pó de sálvia de Pavlić et al. (2017), foi relatado que o aumento da pressão de 100 para 200 bar, na temperatura de 50 °C proporcionou um aumento significativo no rendimento da extração. Esse aumento de pressão leva ao aumento da densidade do CO₂, aumentando seu poder solvente e reduzindo a seletividade para compostos voláteis. Já o aumento da temperatura ocasiona a redução da densidade e afeta a pressão de vapor dos solutos, causando o aumento da solubilidade (PAVLÍĆ et al., 2017).

Portanto, temperaturas muito baixas diminuem a solubilidade e temperaturas mais elevadas podem ocasionar a degradação dos compostos. Logo, para recuperar compostos voláteis do lúpulo utilizando CO₂, sugere-se empregar temperaturas mais amenas (5 – 10 °C) afim de preservar suas propriedades. A densidade do CO₂ nas condições utilizadas para extração (P = 100 bar e T = 7°C) foi de 0,937 g/cm³, e proporcionou ótimos rendimentos globais de extração em comparação com a técnica de hidrodestilação. A Figura 13 apresenta as cinéticas de extração dos diferentes lúpulos, empregando dióxido de carbono subcrítico como solvente.

Figura 13: Cinéticas de extração dos lúpulos El dorado, Polaris, H-Blanc e Callista, empregando dióxido de carbono subcrítico.



Fonte: O Autor (2021).

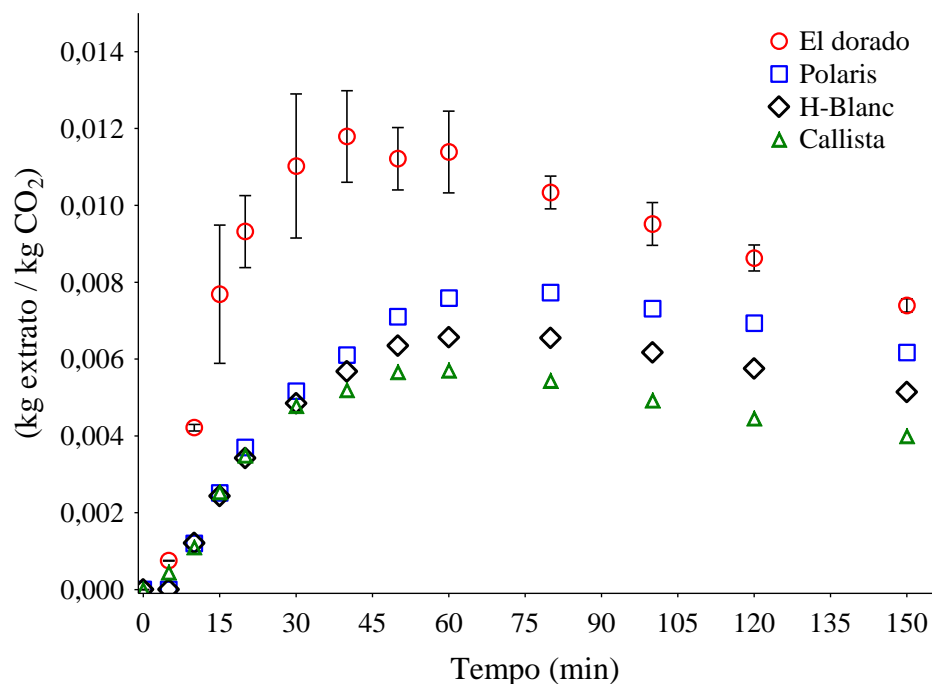
Para os lúpulos Polaris, H-Blanc e Callista, as cinéticas na Figura 13 mostram uma taxa de extração constante entre 0 e 60 minutos (período CER – *constant extraction rate*); taxa de

extração decrescente entre 60 e 100 minutos (período FER – *falling extraction rate*); e estabilidade após os 100 minutos até o final da extração (período LER – *low extraction rate* ou DC – *diffusion controlled*). A cinética de extração para o lúpulo El dorado apresentou um comportamento diferente, com uma maior taxa de extração durante o período CER (0 a 40 minutos) em comparação com as outras variedades.

Esses diferentes períodos da extração são controlados por diferentes mecanismos de transferência de massa, onde no período CER predomina a convecção; durante FER inicia o mecanismo de difusão operando juntamente com a convecção; e no final ocorre principalmente a difusão no interior das partículas sólidas, caracterizando o período LER ou DC (DA SILVA, ROCHA-SANTOS & DUARTE, 2016).

De acordo com Pereira e Meireles (2010), as curvas cinéticas permitem avaliar os fenômenos de transferência de massa (convecção, difusão) e as limitações termodinâmicas do processo de extração. Em muitas aplicações, a extração pode ser finalizada nos tempos iniciais, onde a maior parte dos compostos de interesse é obtida (50-90% do rendimento total). Para determinar o tempo ideal de extração deve-se levar em conta não só o rendimento e as propriedades bioativas, mas também o consumo de solvente e fatores econômicos, conforme apresentado na Figura 14.

Figura 14: Relação de rendimento de extrato e consumo de solvente no decorrer da extração.



Fonte: O Autor (2021).

A relação apresentada na Figura 14 está ligada aos mecanismos de transferência de massa e a viabilidade do processo. Observa-se que no período de 30 a 60 minutos para o lúpulo El dorado; de 60 a 80 minutos para os lúpulos Polaris e H-Blanc; e de 50 a 60 minutos para o lúpulo Callista, a relação [massa de extrato / massa de CO₂] é máxima. É nesse período em que ocorre a transição de CER para FER. Com a redução da taxa de extração e a predominância de mecanismos difusivos, a continuidade da extração torna-se inviável, pois a recuperação dos compostos de interesse é baixa e o consumo de CO₂ continua constante.

De acordo com Pavlić et al. (2020), a viabilidade econômica do processo de extração em sistemas pressurizado, deve levar em consideração o consumo de energia e o custo operacional de cada caso, bem como o rendimento dos compostos de interesse e o gasto de solvente. Dessa forma sugere-se que a extração poderia ser conduzida até 60 minutos para El dorado, e até 80 minutos para Polaris, H-Blanc e Callista. A partir destes tempos, é observado o decréscimo da relação [massa de extrato / massa de CO₂].

5.2. Caracterização química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram analisados por CG-EM, e o perfil químico dos compostos majoritários está apresentado na Tabela 6. Ao total, 21 compostos foram identificados, os cromatogramas estão em anexo no Apêndice I. O composto presente em maior concentração em todas as amostras analisadas é β -Mirceno, considerado o principal constituinte do óleo essencial de lúpulo.

β -mirceno é um monoterpene de odor agradável que ocorre principalmente no óleo essencial de capim-limão, louro e lúpulo, mas também pode ser encontrado em frutas e especiarias como tomilho, salsa, manjeriço, cardamomo, manga e laranja. É também o terpeno mais abundante na cannabis e pode ser sintetizado a partir do β -pineno. Além disso, β -mirceno é um importante composto intermediário na produção de outros químicos aromáticos utilizados em cosméticos, sabonetes e aromatizantes em alimentos e bebidas (FELTER et al., 2020).

Além do β -mirceno, outras moléculas como α e β -pineno, limoneno, copaeno, α e β -cariofileno, α -amorfeno, β -silineno, α -guaieno e δ -cadieno, juntamente com alguns ácidos orgânicos também foram identificados como compostos em comum presentes nos óleos essenciais das quatro variedades de lúpulo analisadas. Com exceção da variedade H-Blanc, o cariofileno foi o segundo constituinte majoritário nos óleos essenciais dos lúpulos estudados. As variedades Polaris e Callista apresentaram as maiores concentrações de α -cariofileno (24,48 e 26,74% respectivamente).

Tabela 6: Composição química dos óleos essenciais de lúpulo (El dorado, Polaris, H-Blanc e Callista) por análise de CG-EM.

T.R. (min.)	Nome do Composto	Fórmula Molecular	Área do Pico (%)			
			El dorado	Polaris	H-Blanc	Callista
7,26	Isobutirato de isobutila	C ₈ H ₁₆ O ₂	0,16	0,63	-	-
7,66	Alfa-pineno	C ₁₀ H ₁₆	0,25	0,21	0,27	0,05
7,96	Canfeno	C ₁₀ H ₁₆	-	-	0,22	-
8,42	Propanoato de 2-metilbutil	C ₈ H ₁₆ O ₂	-	0,24	-	-
8,53	Beta-pineno	C ₁₀ H ₁₆	0,65	0,79	0,25	0,87
8,81	Beta-mirceno	C ₁₀ H ₁₆	62,21	55,58	67,57	48,62
9,22	Isobutirato de Isoamila	C ₈ H ₁₈ O ₂	0,15	0,56	0,16	-
9,28	Isobutirato de 2-metilbutilo	C ₉ H ₁₈ O ₂	1,64	2,59	1,14	0,36
9,54	Limoneno	C ₁₀ H ₁₆	0,71	0,54	1	0,37
9,90	Beta-ocimeno	C ₁₀ H ₁₆	-	1,19	-	-
15,46	Copaeno	C ₁₅ H ₂₄	0,44	0,4	0,13	0,29
16,27	Beta-cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	8,86	9	2,47	7,01
16,91	Alfa-cariofileno	C ₁₅ H ₂₄	13,06	24,48	2,6	26,74
17,29	Alfa-amorfeno	C ₁₅ H ₂₄	1,02	0,64	1,42	1,1
17,56	Beta-selineno	C ₁₅ H ₂₄	2,19	0,2	11,19	3,84
17,73	Alfa-guaieno	C ₁₅ H ₂₄	1,93	0,59	11,17	3,85
17,83	Isobutirato de geranila	C ₁₄ H ₂₄ O ₂	1,22	0,37	-	-
18,09	Gama-muuroleno	C ₁₅ H ₂₄	0,73	0,71	-	0,78
18,23	Delta-cadinano	C ₁₅ H ₂₄	0,61	1,28	0,41	1,38
19,67	Óxido de cariofileno	C ₁₅ H ₂₄ O	2,18	-	-	0,87
20,29	Epóxido de alfa-pineno	C ₁₀ H ₁₆ O	1,9	-	-	3,87
	Monoterpenos		63,82	58,31	69,31	49,91
	Sesquiterpenos		28,84	37,3	29,39	44,99
	Ésteres		3,17	4,39	1,3	0,36
	Epóxidos		4,08	-	-	4,74
	Total de compostos identificados		99,91	100	100	100

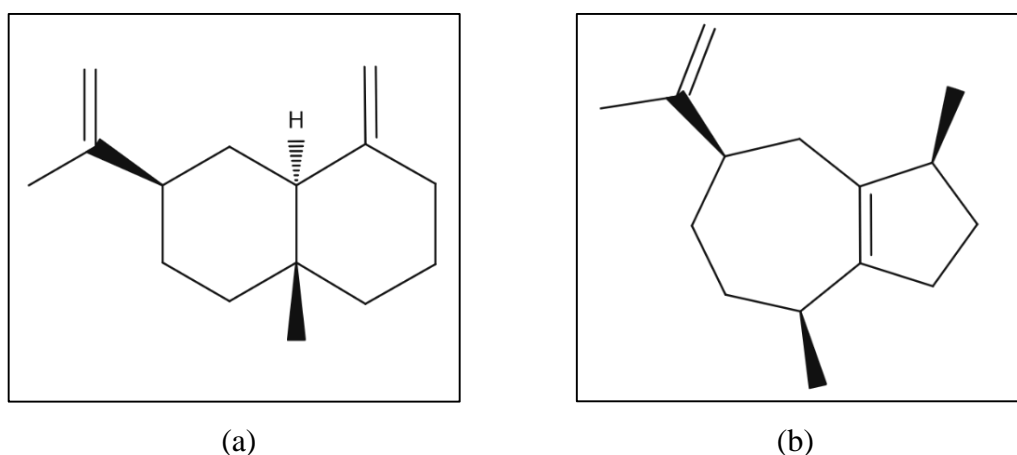
Fonte: O Autor (2021).

O cariofileno está presente em diversos óleos essenciais de diferentes plantas, e é encontrados frequentemente como uma mistura de isômeros γ -cariofileno (isocariofileno), α -cariofileno e β -cariofileno (LEGAULT e PICHETTE, 2007). O α -cariofileno é também conhecido como α -humuleno, um dos principais compostos responsáveis pelo aroma de lúpulo (BENELLI et al., 2018). O β -cariofileno é um dos terpenóides que contribuem para o sabor picante do óleo de pimenta-do-reino. Além disso, é conhecido por possuir atividade anti-inflamatória e anestésica local, e é um composto utilizado em misturas de especiarias, sabores cítricos, sabonetes, detergentes, cremes e loções, e uma variedade de produtos alimentícios e bebidas (SABULAL et al., 2006).

O lúpulo H-Blanc apresentou uma baixa concentração de β -cariofileno e α -cariofileno (2,47 e 2,60% respectivamente) em comparação com as demais variedades, entretanto β -selineno e α -guaiano se destacam nessa variedade com 11,19 e 11,17% respectivamente. O β -selineno (Figura 15 a) foi encontrado no óleo das folhas e frutas de *Callicarpa macrophylla*, uma espécie de arbusto pertencente à família Verbenaceae, comumente encontrada na região indiana do Himalaia (SINGH et al., 2010; CHANDRA et al., 2017).

O α -guaiano (Figura 15 b) é um dos compostos amplamente encontrados no óleo de patchouli (*Pogostemon cablin*), uma das principais commodities dos óleos essenciais da Indonésia (NURJANAH, RIALITA e LEMBONG, 2020). Um dos principais produtos de oxidação formado naturalmente a partir do α -guaiano, é a rotundona, que é um odorante de impacto conhecido pelo aroma apimentado, identificado em uma grande variedade de ervas, especiarias e em algumas variedades de vinho (HUANG et al., 2015).

Figura 15: Estrutura química do (a) β -selineno e (b) α -guaiano.



Fonte: O Autor (2021).

Santagostini et al. (2020) identificaram recentemente 45 compostos no óleo essencial de lúpulo da variedade Cascade. Os perfis dos óleos essenciais analisados ao longo de 3 anos também mostraram o mirceno como componente principal, além de α -humuleno, β -cariofileno, β -farneseno e epóxido de humuleno II. Justen (2019) identificou 40 compostos da variedade de lúpulo Hallertauer Mittelfrüh, 24 compostos da variedade Columbus, e 26 compostos da variedade Saaz. Os três principais compostos observados nas três variedades de lúpulo também foram o mirceno, α -humuleno e β -cariofileno.

Dessa forma podemos afirmar que as diferentes variedades de lúpulo possuem óleos essenciais ricos em compostos de aroma, e que cada variedade contribui para as características

sensoriais da cerveja de acordo com seu perfil químico, mas que os compostos majoritários em comum são o mirceno, α -humuleno e β -cariofileno.

5.3. Fenólicos e flavonoides totais dos extratos de lúpulo

Os extratos de lúpulo obtidos por CO₂ subcrítico foram caracterizados quanto ao teor total de compostos fenólicos e flavonoides (Tabela 7). Em relação aos compostos fenólicos, não houve diferença significativa entre as variedades de lúpulo, sendo que os teores variaram de 81,48 a 82,13 mgEAG/mg de extrato. Para o teor de flavonoides, o lúpulo Polaris apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) das demais variedades, sendo a maior concentração obtida (54,24 mgEQ/g de extrato), enquanto o lúpulo Callista apresentou o menor teor das variedades estudadas (22,57 mgEQ/g de extrato). Os lúpulos El dorado e H-Blanc não apresentaram diferença significativa entre si para flavonoides, com teores de 35,91 e 37,02 mgEQ/g de extrato respectivamente.

Tabela 7: Teor total de compostos fenólicos e flavonoides de extratos de lúpulo.

Lúpulo	Compostos Fenólicos (mgEAG/mg extrato)	Flavonoides (mgEQ/g extrato)
El dorado	82,13 ^a ± 0,87	35,91 ^b ± 0,37
Polaris	81,77 ^a ± 0,86	54,24 ^a ± 0,46
H-Blanc	81,91 ^a ± 0,92	37,02 ^b ± 0,56
Callista	81,48 ^a ± 0,87	22,57 ^c ± 0,11

Médias ± desvio padrão seguida de letras/colunas iguais indicam não haver diferença significativa a nível de 95 % (Teste de Tukey).

Os teores de compostos fenólicos e flavonoides obtidos com CO₂ subcrítico estão acima dos valores obtidos por Kowalczyk et al. (2013) que relataram teores de compostos fenólicos de 17,13 a 73,49 mgEAG/g, e de flavonoides de 1,11 a 16,54 mgEQ/g em extratos de lúpulo das variedades Magnum e Marynka, empregando água, metanol e etanol como solvente. No estudo de Veiga et al. (2021), extratos utilizando CO₂ supercrítico e proprano de uma variedade brasileira de lúpulo, apresentaram teores de compostos fenólicos acima dos obtidos neste trabalho. O conteúdo de compostos fenólicos variou de 87 a 189 mgEAG/g, e o de flavonoides de 18 a 93 EC/g (equivalentes de catequina).

Onder, Ay e Sarker (2013), identificaram por LC-MS/MS, kaempferol 3-O glucosídeo, quercetina, ácido ascórbico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido elágico, ácido p-cumárico, epigalol e pirogalol como sendo compostos fenólicos predominantes em extratos de *H. lupulus*

spp coletados em Balıkesir (Turquia). Por outro lado, Keskin et al. (2013) relataram a presença de luteolina, rutina, ácido ferúlico e catequina como os compostos fenólicos mais abundantes em extratos de cones de lúpulo de Bilecik (Turquia). Cabe ressaltar que a composição fenólica do lúpulo pode variar dependendo da variedade de lúpulo, a época e o ano de colheita.

5.4. Atividade Antioxidante

De acordo com os dados da Tabela 8, os extratos supercríticos apresentaram uma atividade antioxidante consideravelmente maior que dos óleos essenciais dos lúpulos estudados. Todos os óleos essenciais de lúpulo apresentaram diferença significativa entre si, e também entre as técnicas de extração utilizadas. A variedade Polaris apresentou a melhor atividade antioxidante dos óleos essenciais e dos extratos por CO₂ subcrítico, com CI₅₀ de 1,220 e 0,016 mg/mL respectivamente.

Tabela 8: Atividade antioxidante de óleos essenciais e extratos de lúpulo.

Lúpulo	CI ₅₀ DPPH (mg/mL)	
	Óleo essencial	Extrato por CO ₂ Subcrítico
El dorado	2,801 ^{Ac} ± 0,114	0,019 ^{Ba} ± 0,001
Polaris	1,220 ^{Ad} ± 0,046	0,016 ^{Bb} ± 0,001
H-Blanc	13,443 ^{Aa} ± 1,174	0,017 ^{Bab} ± 0,001
Callista	5,854 ^{Ab} ± 0,085	0,018 ^{Bab} ± 0,001

Médias ± desvio padrão seguida de letras maiúsculas iguais nas linhas e em minúsculas nas colunas indicam não haver diferença significativa a nível de 95 % (Teste de Tukey) entre a técnica de extração e a variedade de lúpulo respectivamente.

Todos os extratos por CO₂ subcrítico apresentaram uma ótima atividade antioxidante, com CI₅₀ entre 0,016 e 0,019 mg/mL. Embora houve diferença significativa somente entre as variedades El dorado e Polaris, estas foram estatisticamente similares as variedades H-Blanc e Callista. Considerando que foram obtidos teores semelhantes de compostos fenólicos totais para as diferentes variedades de lúpulo, podemos dizer que estes compostos contribuíram para a boa atividade antioxidante observada.

Geralmente a atividade antioxidante de extratos de plantas está correlacionada com a presença de ácidos fenólicos, flavonoides e outros polifenóis. Estes compostos apresentam um ou mais grupos hidroxila, conjugados a um grupo hidrocarboneto aromático, e, dependendo da posição e do número de hidroxilas, a atividade antioxidante é maior ou menor (ALMEIDA et al., 2020).

Krofta, Mikyška e Hašková (2008) avaliaram o efeito da secagem, moagem, peletização, envelhecimento e armazenamento na atividade antioxidante de cones de lúpulo. O processo de secagem causou perda de atividade antioxidante, enquanto a moagem e peletização do lúpulo não afetaram a atividade antioxidante de lúpulo. Durante o armazenamento, os autores também relataram uma redução da atividade antioxidante do lúpulo em função da temperatura e da forma de armazenamento.

5.5. Atividade antimicrobiana

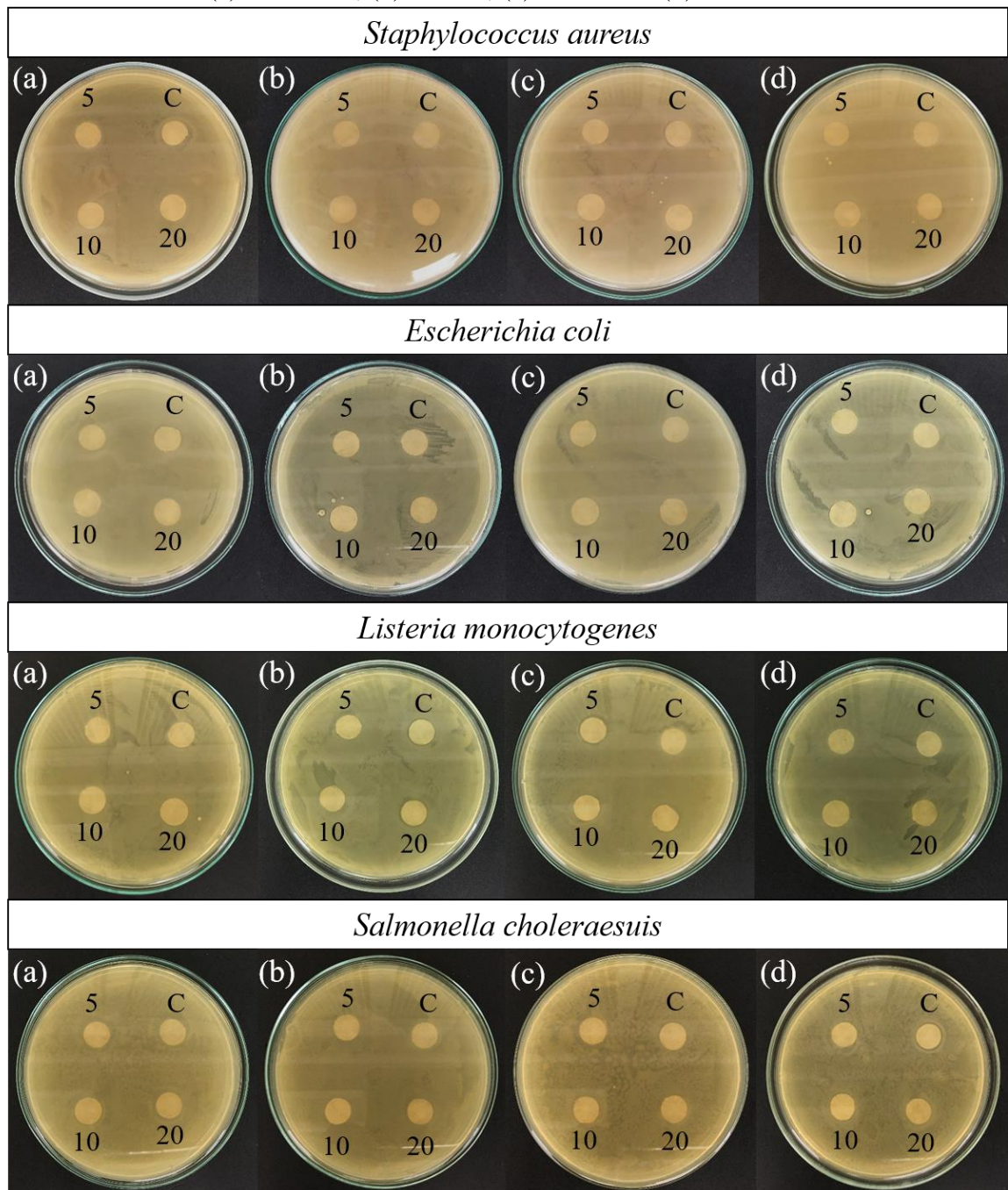
As Figuras 16 e 17 apresentam os testes de atividade por difusão em discos contra *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. choleraesuis*, dos óleo essenciais e dos extratos de lúpulo respectivamente.

De todos os produtos testados apenas o extrato de Polaris apresentou uma pequena inibição para *E. coli* em dois dos três discos; o extrato de El dorado para *L. monocytogenes* em um dos discos; e o extrato de Polaris e Callista para *S. choleraesuis*. Os óleos essenciais das quatro variedades de lúpulos utilizadas não demonstraram potencial antimicrobiano para nenhum dos microrganismos testados.

Extratos de lúpulo ricos em óleos essenciais são menos ativos, mas possuem uma atividade antimicrobiana leve a moderada contra algumas bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica*, o que não foi observado no presente estudo. Já os extratos de lúpulo ricos em compostos fenólicos prenilados, como o xantohumulol, geralmente demonstram eficácia contra cepas de bactérias Gram-positivas, como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* e *Mycobacterium* (BOCQUET, SAHPAZ e RIVIÈRE, 2018).

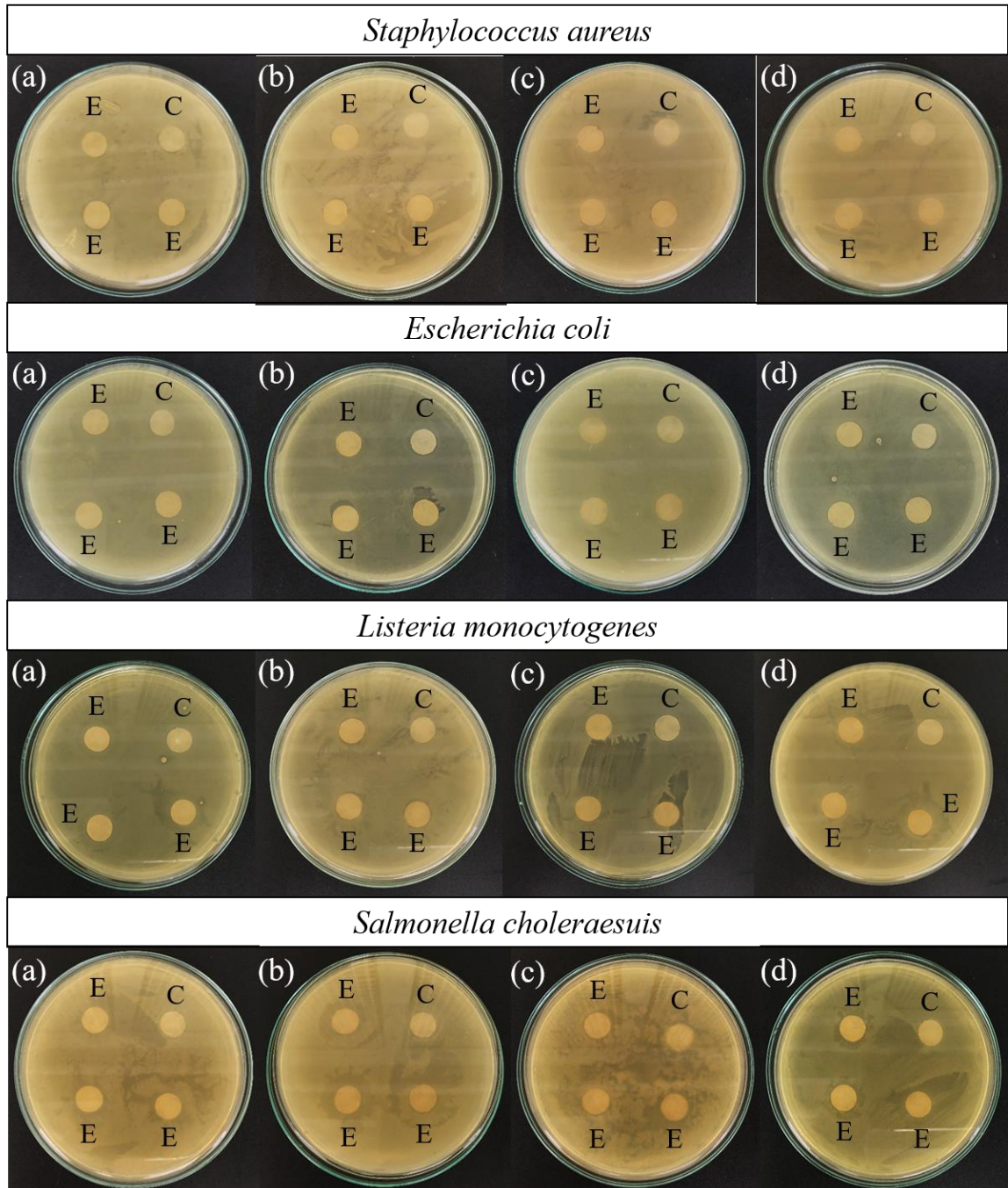
Abram et al. (2015) obtiveram uma ótima atividade antimicrobiana de extratos de lúpulo contra *S. aureus*, com CIM na faixa de 0,0013 a 0,0029 mg/mL. Para *E. coli* a atividade foi de moderada, com CIM de 0,19 a 0,43 mg/mL. Bartmańska et al. (2018) ao estudar a atividade antimicrobiana de flavonoides de lúpulo e seus derivados relataram uma boa inibição de bactérias do gênero *Staphylococcus*, com CIM igual ou inferior a 0,05 mg/mL. Contudo para *Listeria monocytogenes* nenhum dos compostos selecionados mostrou atividade inibitória e somente um dos compostos, auronol, foi capaz de inibir *Salmonella typhimurium* na concentração de 0,05 mg/mL. Stompor e Zarowska (2016) também estudaram a atividade antimicrobiana de análogos estruturais do xantohumulol presente no lúpulo e observaram a inibição de *S. aureus* por apenas 4 dos 11 compostos testados, enquanto para *E. coli*, nenhum dos compostos mostrou atividade.

Figura 16: Teste de atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de lúpulo das variedades (a) El dorado, (b) Polaris, (c) H-Blanc e (d) Callista.



C – disco controle negativo sem adição de óleo; 5 – disco com 5 μL de óleo essencial; 10 – disco com 10 μL de óleo essencial; 20 – disco com 20 μL de óleo essencial.

Figura 17: Teste de atividade antimicrobiana dos extratos de lúpulo das variedades (a) El dorado, (b) Polaris, (c) H-Blanc e (d) Callista.



C – disco controle negativo sem adição de extrato; E – disco com 20 µL de extrato de lúpulo a 50 mg/mL.

O potencial antimicrobiano é aumentado pelo grau de hidrofobicidade, no entanto, na prática, especialmente na cerveja, os iso- α -ácidos tem uma eficácia melhor devido a sua melhor solubilidade em água e na cerveja do que os α e β -ácidos (BOCQUET, SAHPAZ e RIVIÈRE, 2018). Em bactérias Gram-negativas, segundo Kramer et al. (2015), a membrana celular externa atua como uma barreira para substâncias hidrofóbicas e inibe a difusão de vários agentes bactericidas.

As duas principais resinas do lúpulo (iso- α -ácidos e β -ácidos) possuem atividade antimicrobiana a microrganismos sensíveis após a exposição por mais de uma hora e menos de 24 horas. Contudo, algumas cepas como *S. salivarium* e *S. aureus* podem desenvolver resistência a estes compostos (HAAS e BARSOUMIAN, 1994).

Neste estudo não foi observado uma ação antimicrobiana eficiente dos óleos essenciais e extratos de lúpulo na concentração utilizada, o que pode estar ligado a fatores de resistência dos microrganismos utilizados, a baixa concentração de extrato, ou ainda a volatilidade dos óleos essenciais.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo foram obtidos óleos essenciais e extratos de quatro variedades de lúpulo empregando hidrodestilação e CO₂ subcrítico como solvente de extração. A hidrodestilação apresentou rendimentos na faixa de 0,38 – 1,44 % (m/m) de óleo essencial. Foi determinado o perfil químico dos óleos essenciais de lúpulo, onde o composto majoritário em comum nas quatro variedades foi o β-mirceno.

A análise das curvas cinéticas de extração de lúpulo em sistema pressurizado indica 60 minutos para El dorado e 80 minutos para os demais lúpulos como tempo ideal de extração. Os rendimentos globais de extração com CO₂ subcrítico foram na faixa de 8,35 – 15,18% (m/m), consideravelmente maiores que por hidrodestilação. Todos os extratos por CO₂ subcrítico mostraram uma boa atividade antioxidante (IC₅₀ de 0,016 a 0,019 mg/mL) e teor de compostos fenólicos semelhantes (de 81,13 a 82,48 mgEAG/g). Em relação a atividade antimicrobiana, tanto os extratos quanto os óleo essenciais dos lúpulos não demonstraram eficiência contra *S. aureus*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. choleraesuis*.

O desenvolvimento deste estudo possibilitou a identificação dos compostos de aroma presentes nos óleos essenciais dos lúpulos estudados. Além disso, o CO₂ no estado subcrítico demonstrou eficiência para extrair compostos bioativos do lúpulo. Existe uma variedade de lúpulos comerciais, cada um com uma finalidade de aplicação conforme com suas características químicas. Os produtos de lúpulo obtidos neste trabalho tem potencial para ser empregados na indústria cervejeira como aromatizantes e antioxidantes naturais.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados alcançados, sugere-se a realização dos seguintes tópicos para trabalhos futuros:

- Realizar a caracterização química dos extratos obtidos com dióxido de carbono subcrítico;
- Avaliar o comportamento de fases do sistema contendo extrato de lúpulo e dióxido de carbono supercrítico bem como determinar os parâmetros termodinâmicos de difusividade;
- Avaliar outros fluidos (refrigerantes, hidrocarbonetos de cadeia curta) como solventes no processo de extração em sistemas pressurizados bem como o uso de co-solventes;
- Avaliar a toxicidade dos extratos e óleos essenciais de lúpulo;
- Aplicar os extratos obtidos na elaboração de cervejas.

8. REFERÊNCIAS

- ABERL, A.; COELHAN, M. Determination of volatile compounds in different hop varieties by headspace-trap GC/MS – In comparison with conventional hop essential oil analysis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 11, p. 2785-2792, 2012. doi: <https://doi.org/10.1021/jf205002p>
- ABRAM, V. et al. A comparison of antioxidant and antimicrobial activity between hop leaves and hop cones. **Industrial crops and products**, v. 64, p. 124-134, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.11.008>
- ADADI, P.; BARAKOVA, N. V.; KRIVOSHAPKINA, E. F. Selected methods of extracting carotenoids, characterization, and health concerns: A review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 66, n. 24, p. 5925-5947, 2018. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01407>
- ALGAZZALI, V.; SHELLHAMMER, T. Bitterness intensity of oxidized hop acids: Humulinones and hulupones. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 74, n. 1, p. 36-43, 2016. doi: <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2016-1130-01>
- ALMAGUER, C. et al. 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. doi: <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2015-0327-01>
- ALMEIDA, A. R. et al. Bioactive compounds and antioxidant activities of Brazilian hop (*Humulus lupulus* L.) extracts. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 1, p. 340-347, 2020. doi: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14311>
- ALUPULUI, A.; CALINESCU, I.; LAVRIC, V. Microwave extraction of active principles from medicinal plants. **UPB Science Bulletin, Series B**, v. 74, n. 2, p. 129-142, 2012. ISSN: 1454-2331
- ANDREU, V.; PICÓ, Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 709-721, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.038>
- ARSENE, ANDREEA LETIȚIA et al. Study on antimicrobial and antioxidant activity and phenolic content of ethanolic extract of *Humulus lupulus*. **Farmacia**, v. 63, n. 6, p. 851-857, 2015.
- AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of food engineering**, v. 117, n. 4, p. 426-436, 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- AZWANIDA, N. N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. **Med Aromat Plants**, v. 4, n. 196, p. 2167-0412, 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>

BAIERLE, R. E. Cultivo de Lúpulo no Brasil, história e perspectivas. **BrewBlog**, 14 de jul de 2020. Disponível em: <https://www.lamasbrewshop.com.br/blog/2020/07/cultivo-de-lupulo-no-brasil.html> Acesso em: 09/11/2020.

BARTMAŃSKA, A. et al. Antimicrobial properties of spent hops extracts, flavonoids isolated therefrom, and their derivatives. **Molecules**, v. 23, n. 8, p. 2059, 2018. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules23082059>

BEDINI, S. et al. *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus* essential oils as novel control tools against the invasive mosquito *Aedes albopictus* and fresh water snail *Physella acuta*. **Industrial crops and products**, v. 85, p. 318-323, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.03.008>

BENELLI, G. et al. Insecticidal activity of camphene, zerumbone and α -humulene from *Cheilocostus speciosus* rhizome essential oil against the Old-World bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 148, p. 781-786, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.044>

BERTELLI, D. et al. Nuclear magnetic resonance and high-performance liquid chromatography techniques for the characterization of bioactive compounds from *Humulus lupulus* L. (hop). **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 410, n. 15, p. 3521-3531, 2018. doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0851-y>

BOCQUET, L. et al. Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. **Industrial Crops and Products**, v. 122, p. 290-297, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.061>

BOCQUET, L.; SAHPAZ, S.; RIVIÈRE, C. An overview of the antimicrobial properties of hop. In: **Natural antimicrobial agents**. Springer, Cham, 2018. p. 31-54. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-67045-4_2

BRAND-WILLIAMS, W., CULIVER M.E., & BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v.28 n.1, p.25-30, 1995. doi: [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5).

BAUTZ, H.; POLZER, J.; STIEGLITZ, L. Comparison of pressurised liquid extraction with Soxhlet extraction for the analysis of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans from fly ash and environmental matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 815, n. 2, p. 231-241, 1998. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00453-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00453-1)

CAMINHOÁ, L. Agricultura Prática: Cultura do Lúpulo. **Revista Agrícola do Imperial Instituto Fluminense de Agricultura**, v. 16, p. 37-42, Rio de Janeiro, mar. 1885. Disponível em: https://issuu.com/redelupulo/docs/agricultura_pratica_a_cultura_do_lu Acesso em: 09/11/2020.

CARABIAS-MARTÍNEZ, R. et al. Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1089, n. 1-2, p. 1-17, 2005. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.072>

CARBONE, K. et al. Exploring the potential of microwaves and ultrasounds in the green extraction of bioactive compounds from *Humulus lupulus* for the food and pharmaceutical industry. **Industrial Crops and Products**, v. 156, p. 112888, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112888>

CHADWICK, L. R.; PAULI, G. F.; FARNSWORTH, N. R. The pharmacognosy of *Humulus lupulus* L. (hops) with an emphasis on estrogenic properties. **Phytomedicine**, v. 13, n. 1-2, p. 119-131, 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.07.006>

CHAN, C. H. et al. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 37, p. 6213-6225, 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.040>

CHANDRA, M. et al. β -Selinene rich essential oils from the parts of *Callicarpa macrophylla* and their antioxidant and pharmacological activities. **Medicines**, v. 4, n. 3, p. 52, 2017. doi: <https://doi.org/10.3390/medicines4030052>

CHEMAT, F. et al. A review of sustainable and intensified techniques for extraction of food and natural products. **Green Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 2325-2353, 2020. doi: <https://doi.org/10.1039/C9GC03878G>

CHEMAT, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 34, p. 540-560, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>

ČULÍK, J. et al. Extraction of bitter acids from hops and hop products using pressurized solvent extraction (PSE). **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, n. 3, p. 220-225, 2009. doi: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00372.x>

DAOUDAND, I. S.; KUSINSKI, S. Liquid CO₂ and ethanol extraction of hops: Part I: Effect of hop deterioration on extraction efficiency and extract quality. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 98, n. 1, p. 37-41, 1992. doi: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1992.tb01090.x>

DAOUD, I. S.; KUSINSKI, S. Liquid CO₂ and ethanol extraction of hops: Part II – Effect of hop deterioration on the time course of extraction. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 99, n. 1, p. 39-41, 1993. doi: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1993.tb01144.x>

DA ROSA ALMEIDA, A. et al. Brazilian Grown Cascade Hop (*Humulus lupulus* L.): LC-ESI-MS-MS and GC-MS Analysis of Chemical Composition and Antioxidant Activity of Extracts and Essential Oils. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, p. 1-11, 2020. doi: <https://doi.org/10.1080/03610470.2020.1795586>

DA SILVA, R. P. F. F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40-51, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.11.013>

DEL VALLE, J. M. et al. Supercritical CO₂ extraction of Chilean hop (*Humulus lupulus*) ecotypes. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 13, p. 1349-1356, 2003. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.1547>

DHOOGHE, L. et al. Quantification of xanthohumol, isoxanthohumol, 8-prenylnaringenin, and 6-prenylnaringenin in hop extracts and derived capsules using secondary standards. **Talanta**, v. 83, n. 2, p. 448-456, 2010. doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.041>

DI VIESTI, V. et al. Increased sexual motivation in female rats treated with *Humulus lupulus* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 514-517, 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.12.040>

DRESEL, M.; DUNKEL, A.; HOFMANN, T. Sensomics analysis of key bitter compounds in the hard resin of hops (*Humulus lupulus* L.) and their contribution to the bitter profile of Pilsner-type beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 13, p. 3402-3418, 2015. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00239>

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ JR, St. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 900-919, 2019. doi: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>

EYRES, G. T.; DUFOUR, J. P. Hop essential oil: Analysis, chemical composition and odor characteristics. In: **Beer in health and disease prevention**. Academic Press, 2009. p. 239-254. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00022-5>

EYRES, G. T.; MARRIOTT, P. J.; DUFOUR, J. P. Comparison of odor-active compounds in the spicy fraction of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oil from four different varieties. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 15, p. 6252-6261, 2007. doi: <https://doi.org/10.1021/jf070739t>

FAGHERAZZI, M. et al. Análise de custo de implantação de lúpulo na região do planalto sul catarinense. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa-Congrega Urcamp**, v. 15, n. 15, p. 721-730, 2018. ISSN: 2526-4397

FELTER, S. P. et al. How the 62-year old Delaney Clause continues to thwart science: Case study of the flavor substance β -myrcene. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, p. 104708, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104708>

FORINO, M. et al. Humudifucol and bioactive prenylated polyphenols from hops (*Humulus lupulus* cv. "Cascade"). **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 590-597, 2016. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01052>

FORMATO, A. et al. Supercritical fluid extraction of α - and β -acids from hops compared to cyclically pressurized solid-liquid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 84, p. 113-120, 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2013.09.021>

FORTESCHI, M. et al. Quality assessment of Cascade Hop (*Humulus lupulus* L.) grown in Sardinia. **European Food Research and Technology**, v. 245, n. 4, p. 863-871, 2019. doi: <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3215-0>

GALLEGO, R.; BUENO, M.; HERRERO, M. Sub-and supercritical fluid extraction of bioactive compounds from plants, food-by-products, seaweeds and microalgae – An update. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 198-213, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.030>

GALLO, M.; FERRARA, L.; NAVIGLIO, D. Application of ultrasound in food science and technology: A perspective. **Foods**, v. 7, n. 10, p. 164, 2018. doi: <https://doi.org/10.3390/foods7100164>

GANDHI, K.; ARORA, S.; KUMAR, A. Industrial applications of supercritical fluid extraction: a review. **Int. J. Chem. Stud**, v. 5, n.3 p. 336-340, 2017. ISSN: 2321-4902

GARDNER, D. S. Commercial scale extraction of alpha-acids and hop oils with compressed CO₂. In: **Extraction of natural products using near-critical solvents**. Springer, Dordrecht, 1993. p. 84-100. doi: https://doi.org/10.1007/978-94-011-2138-5_4

GARRIDO, G.; ORTIZ, M.; POZO, P. Fenoles y flavonoides totales y actividad antioxidante de extractos de hojas de *Lampaya medicinalis* F. Phil. **Journal of pharmacy & pharmacognosy research**, v. 1, n. 1, p. 30-38, 2013. ISSN 0719-4250.

GAVAHIAN, M.; FARAHNAKY, A. Ohmic-assisted hydrodistillation technology: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 72, p. 153-161, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.12.014>

GERHÄUSER, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1941-1954, 2005a. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2005.04.012>

GERHÄUSER, C. Broad spectrum antiinfective potential of xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) in comparison with activities of other hop constituents and xanthohumol metabolites. **Molecular nutrition & food research**, v. 49, n. 9, p. 827-831, 2005b. doi: <https://doi.org/10.1002/mnfr.200500091>

GUO-QING, H. E. et al. Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 6, n. 10, p. 999, 2005. doi: <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.b0999>

HAAS, G. J.; BARSOUMIAN, R. Antimicrobial activity of hop resins. **Journal of Food Protection**, v. 57, n. 1, p. 59-61, 1994. doi: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-57.1.59>

HERRERO, M.; CIFUENTES, A.; IBAÑEZ, E. Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. **Food chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136-148, 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.058>

HOPSTEINER. **Guidelines for hop buying**. 2020. Disponível em: <https://www.hopsteiner.com/news/type/guidelines/> Acesso em: 03/11/2020.

HUANG, A. C. et al. Mechanistic studies on the autoxidation of α -guaiene: structural diversity of the sesquiterpenoid downstream products. **Journal of natural products**, v. 78, n. 1, p. 131-145, 2015. doi: <https://doi.org/10.1021/np500819f>

IBGE – Conselho Nacional de Estatística. Nova Petrópolis: Rio Grande do Sul. **Coleção de Monografias**, 2^a série, n. 188, fev. 1959. Disponível em:

<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=7113> Acesso em: 09/11/2020.

IGLESIAS, A. et al. Essential oils from *Humulus lupulus* as novel control agents against Varroa destructor. **Industrial Crops and Products**, v. 158, p. 113043, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113043>

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed., São Paulo, 2008. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf> Acesso em: 17 fev 2021.

INUI, T. et al. Effect of harvest time on some in vitro functional properties of hop polyphenols. **Food Chemistry**, v. 225, p. 69-76, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.002>

JUSTEN, D. S. **Composição química do óleo essencial *Humulus Lupulus* L.** Projeto de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Industrial) – Universidade Federal do Rio Grande, Santo Antônio da Patrulha, RS, 2019.

KEILER, A. M. et al. Evaluation of estrogenic potency of a standardized hops extract on mammary gland biology and on MNU-induced mammary tumor growth in rats. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 174, p. 234-241, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.09.020>

KERROLA, K. Literature review: isolation of essential oils and flavor compounds by dense carbon dioxide. **Food Reviews International**, v. 11, n. 4, p. 547-573, 1995. doi: <https://doi.org/10.1080/87559129509541061>

KESKIN, Ş. et al. An investigation of *Humulus lupulus* L.: Phenolic composition, antioxidant capacity and inhibition properties of clinically important enzymes. **South African Journal of Botany**, v. 120, p. 170-174, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.04.017>

KOBUS-CISOWSKA, J. et al. Composition and in vitro effects of cultivars of *Humulus lupulus* L. hops on cholinesterase activity and microbial growth. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1377, 2019. doi: <https://doi.org/10.3390/nu11061377>

KOVAČEVIČ, M.; KAČ, M. Determination and verification of hop varieties by analysis of essential oils. **Food Chemistry**, v. 77, n. 4, p. 489-494, 2002. doi: [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00114-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00114-0)

KOWALCZYK, D. et al. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 3, p. 103-110, 2013. doi: <https://doi.org/10.1002/jib.73>

KRAMER, B. et al. Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications. **Journal of applied microbiology**, v. 118, n. 3, p. 648-657, 2015. doi: <https://doi.org/10.1111/jam.12717>

KROFTA, K.; MIKYŠKA, A.; HAŠKOVÁ, D. Antioxidant characteristics of hops and hop products. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 114, n. 2, p. 160-166, 2008. doi: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2008.tb00321.x>

LAFONTAINE, S. et al. Impact of harvest maturity on the aroma characteristics and chemistry of Cascade hops used for dry-hopping. **Food chemistry**, v. 278, p. 228-239, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.148>

LAKKA, A. et al. Polyphenol extraction from *Humulus lupulus* (hop) using a neoteric glycerol/L-alanine deep eutectic solvent: Optimisation, kinetics and the effect of ultrasound-assisted pretreatment. **AgriEngineering**, v. 1, n. 3, p. 403-417, 2019. doi: <https://doi.org/10.3390/agriengineering1030030>

LEGAULT, J.; PICHETTE, A. Potentiating effect of β -caryophyllene on anticancer activity of α -humulene, isocaryophyllene and paclitaxel. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 12, p. 1643-1647, 2007. doi: <https://doi.org/10.1211/jpp.59.12.0005>

LERMUSIEAU, G.; BULENS, M.; COLLIN, S. Use of GC-olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3867-3874, 2001. doi: <https://doi.org/10.1021/jf0101509>

LIGOR, M. et al. Comparative gas chromatographic-mass spectrometric evaluation of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oils and extracts obtained using different sample preparation methods. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 7, p. 1433-1442, 2014. doi: <https://doi.org/10.1007/s12161-013-9767-5>

LIU, Y. et al. Antioxidant activities of hops (*Humulus lupulus*) and their products. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 65, n. 2, p. 116-121, 2007. doi: <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2007-0211-01>

MACHADO JR. et al. Modeling of α -acids and xanthohumol extraction in dry-hopped beers. **Food Chemistry**, v. 278, p. 216-222, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.050>

MATSUI, H. et al. The influence of pruning and harvest timing on hop aroma, cone appearance, and yield. **Food chemistry**, v. 202, p. 15-22, 2016. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.058>

MAYE, J.; LEKER, J.; SMITH, R. Preparation of dicyclohexylamine humulinones and dicyclohexylamine hulupones. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 74, n. 1, p. 57-60, 2016. doi: <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2016-1127-01>

MEGA, J. F.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. A produção de cerveja no Brasil. **Revista Citino**, v. 1, n. 1, p. 34-42, 2011. ISSN: 2238-2461.

MILLIGAN, S. R. et al. The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. **The journal of clinical endocrinology & metabolism**, v. 85, n. 12, p. 4912-4915, 2000. doi: <https://doi.org/10.1210/jcem.85.12.7168>

MUSTAFA, A.; TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: A review. **Analytica chimica acta**, v. 703, n. 1, p. 8-18, 2011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.018>

MUZYKIEWICZ, A. et al. Comparison of antioxidant activity of extracts of hop leaves harvested in different years. **Herba Polonica**, v. 65, n. 3, p. 1-9, 2019. doi: <https://doi.org/10.2478/hepo-2019-0013>

NADAR, S. S.; RAO, P.; RATHOD, V. K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. **Food Research International**, v. 108, p. 309-330, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.03.006>

NEGRI, G.; DI SANTI, D.; TABACH, R. Bitter acids from hydroethanolic extracts of *Humulus lupulus* L., Cannabaceae, used as anxiolytic. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 850-859, 2010. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010005000051>

NIKOLIC, D.; VAN BREEMEN, R. B. Analytical methods for quantitation of prenylated flavonoids from hops. **Current analytical chemistry**, v. 9, n. 1, p. 71-85, 2013.

NURJANA, S. et al. Isolation of guaiane from patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) oil using vacuum fractionation distillation. In: **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**. IOP Publishing, 2020. p. 012094. doi: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/443/1/012094>

NUUTINEN, T. Medicinal properties of terpenes found in *Cannabis sativa* and *Humulus lupulus*. **European journal of medicinal chemistry**, v. 157, p. 198-228, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.07.076>

OCVIRK, M.; NEČEMER, M.; KOŠIR, I. J. The determination of the geographic origins of hops (*Humulus lupulus* L.) by multi-elemental fingerprinting. **Food chemistry**, v. 277, p. 32-37, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.070>

ÖNDER, F. C.; AY, M.; SARKER, S. D. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of the extracts of *Humulus lupulus* L. and quantification of bioactive components by LC-MS/MS and GC-MS. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 44, p. 10498-10506, 2013. doi: <https://doi.org/10.1021/jf4031508>

PAUNOVIĆ, D. Đ. et al. Kinetics of the Solid-Liquid Extraction Process of Phenolic Antioxidants and Antioxidant Capacity from Hop (*Humulus lupulus* L.). **Separation Science and Technology**, v. 50, n. 11, p. 1658-1664, 2015. doi: <https://doi.org/10.1080/01496395.2014.978019>

PAVLIĆ, B. et al. Extraction kinetics and ANN simulation of supercritical fluid extraction of sage herbal dust. **The Journal of supercritical fluids**, v. 130, p. 327-336, 2017. doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.015>

PAVLIĆ, B. et al. Supercritical fluid extraction of raspberry seed oil: Experiments and modelling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 157, p. 104687, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104687>

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340-372, 2010. doi: <https://doi.org/10.1007/s11947-009-0263-2>

PISTELLI, L. et al. 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. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.009>

POŁEĆ, K. et al. The influence of the essential oil extracted from hops on monolayers and bilayers imitating plant pathogen bacteria membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, p. 672-680, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.047>

PRENCIPE, F. P. et al. Development of a new high-performance liquid chromatography method with diode array and electrospray ionization-mass spectrometry detection for the metabolite fingerprinting of bioactive compounds in *Humulus lupulus* L. **Journal of Chromatography A**, v. 1349, p. 50-59, 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.097>

PROESTOS, C.; KOMAITIS, M. Antioxidant capacity of hops. In: **Beer in health and disease prevention**. Academic Press, 2009. p. 467-474. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00045-6>

PURI, M.; SHARMA, D.; BARROW, C. J. Enzyme-assisted extraction of bioactives from plants. **Trends in biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 37-44, 2012. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2011.06.014>

RAMOS, L.; KRISTENSON, E. M.; BRINKMAN, U.A. Th. Current use of pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 975, n. 1, p. 3-29, 2002. doi: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)01336-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)01336-5)

RAPINEL, V. et al. 2-Methyloxolane as a Bio-Based Solvent for Green Extraction of Aromas from Hops (*Humulus lupulus* L.). **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1727, 2020. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25071727>

RETTBERG, N.; BIENDL, M.; GARBE, L. A. 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. doi: <https://doi.org/10.1080/03610470.2017.1402574>

REYES-JURADO, F. et al. Essential oils: antimicrobial activities, extraction methods, and their modeling. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 3, p. 275-297, 2015. doi: <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9099-2>

RÓJ, E. et al. Supercritical carbon dioxide hops extracts with antimicrobial properties. **Open Chemistry**, v. 1, n. open-issue, 2015. doi: <https://doi.org/10.1515/chem-2015-0131>

ROUTRAY, W.; ORSAT, V. Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 2, p. 409-424, 2012. doi: <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0573-z>

SABULAL, B. et al. Caryophyllene-rich rhizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 67, n. 22, p. 2469-2473, 2006. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.08.003>

SANTAGOSTINI, L. et al. *Humulus lupulus* L. cv. Cascade grown in Northern Italy: morphological and phytochemical characterization. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 154, n. 3, p. 316-325, 2020. doi: <https://doi.org/10.1080/11263504.2019.1610111>

SHARIF, K. M. et al. Experimental design of supercritical fluid extraction—A review. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105-116, 2014. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.10.003>

SHARP, D. C. et al. Effect of harvest maturity on the chemical composition of Cascade and Willamette hops. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 72, n. 4, p. 231-238, 2014. doi: <http://dx.doi.org/10.1094/ASBCJ-2014-1002-01>

SHARPE, F.R.; LAWS, D. R. J. The essential oil of hops a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 87, n. 2, p. 96-107, 1981. doi: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1981.tb03996.x>

SILVA, D. D. da; et al. Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* korstermans utilizando uma nova coluna capilar POLYH4-MD em cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 461-465, 2003. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422003000400002>

SINGH, A. K. et al. Volatiles of *Callicarpa macrophylla*: a rich source of selinene isomers. **Natural product communications**, v. 5, n. 2, p. 269-272, 2010. doi: <https://doi.org/10.1177/1934578X1000500221>

SKOMRA, U.; KOZIARA-CIUPA, M. Stability of the hop bitter acids during long-term storage of cones with different maturity degree. **Polish Journal of Agronomy**, v. 40, p. 16-24, 2020. doi: <http://dx.doi.org/10.26114%2Fpja.iung.406.2020.40.03>

SOLIVA-FORTUNY, R. et al. Effects of pulsed electric fields on bioactive compounds in foods: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 11-12, p. 544-556, 2009. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.07.003>

STEENACKERS, B.; DE COOMAN, L.; DE VOS, D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. **Food Chemistry**, v. 172, p. 742-756, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.139>

STEVENS, J. F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! **Phytochemistry**, v. 65, n. 10, p. 1317-1330, 2004. doi: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2004.04.025>

STOMPOR, M.; ŽAROWSKA, B. Antimicrobial activity of xanthohumol and its selected structural analogues. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 608, 2016. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules21050608>

ŠTULÍKOVÁ, K. et al. Therapeutic perspectives of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops. **Molecules**, v. 23, n. 3, p. 660, 2018. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules23030660>

SYED, Q. A. et al. Pulsed electric field technology in food preservation: A review. **Journal of Nutritional Health & Food Engineering**, v. 6, n. 6, p. 168-172, 2017. doi: <http://dx.doi.org/10.15406/jnhfe.2017.06.00219>

TANIGUCHI, Y. et al. Analysis of the components of hard resin in hops (*Humulus lupulus* L.) and structural elucidation of their transformation products formed during the brewing process. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 47, p. 11602-11612, 2014. doi: <https://doi.org/10.1021/jf504394h>

TANIGUCHI, Y. et al. Chemical characterization of beer aging products derived from hard resin components in hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 46, p. 10181-10191, 2015. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04138>

TYŚKIEWICZ, K. et al. Essential oils from *Humulus lupulus* scCO₂ extract by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2866, 2018. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules23112866>

VAZQUEZ-ROIG, P.; PICÓ, Y. Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 71, p. 55-64, 2015. doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.014>

VEIGA, B. A. et al. Compressed fluids extraction methods, yields, antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content for Brazilian Mantiqueira hops. **The Journal of Supercritical Fluids**, p. 105155, 2021. doi: <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105155>

VOLLMER, D. M.; LAFONTAINE, S. R.; SHELLHAMMER, T. H. Aroma extract dilution analysis of beers dry-hopped with Cascade, Chinook, and Centennial. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 76, n. 3, p. 190-198, 2018. doi: <https://doi.org/10.1080/03610470.2018.1487746>

YAN, D. et al. Assessment of the phytochemical profiles of novel hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars: A potential route to beer crafting. **Food chemistry**, v. 275, p. 15-23, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.082>

YAN, L. G.; HE, L.; XI, J. High intensity pulsed electric field as an innovative technique for extraction of bioactive compounds—A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2877-2888, 2017. doi: <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1077193>

WANG, M. S. et al. A review of sublethal effects of pulsed electric field on cells in food processing. **Journal of food engineering**, v. 223, p. 32-41, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.11.035>

WEN, C. et al. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops—A review. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 48, p. 538-549, 2018. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>

ZEKOVIĆ, Z.; PFAF-ŠOVLJANSKI, I.; GRUJIĆ, O. Supercritical fluid extraction of hops. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 1, p. 81-87, 2007. doi: <https://doi.org/10.2298/JSC0701081Z>

ZAIDAN, U. H. et al. Biochemical evaluation of phenolic compounds and steviol glycoside from *Stevia rebaudiana* extracts associated with in vitro antidiabetic potential. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 18, p. 101049, 2019. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101049>

ZHANG, J. et al. Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 95, p. 183-195, 2020. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.018>

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. **Chinese medicine**, v. 13, n. 1, p. 20, 2018. doi: <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>

APÊNDICE I

Figura 18: Cromatograma do óleo essencial de lúpulo El dorado por CG-EM.

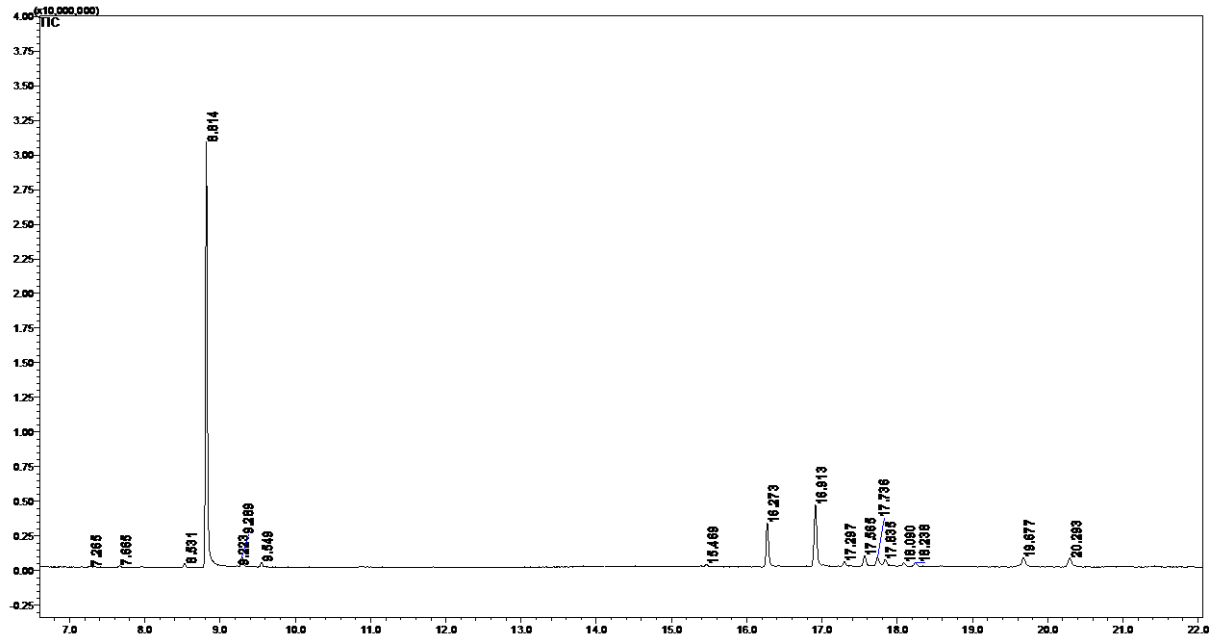
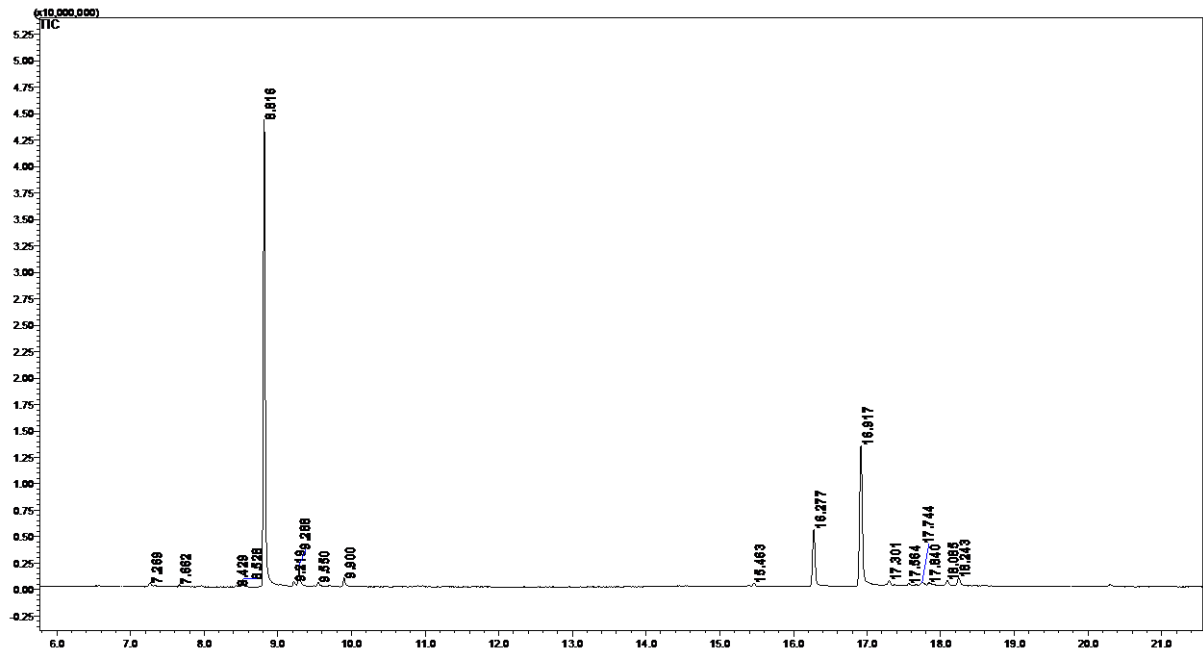


Figura 19: Cromatograma do óleo essencial de lúpulo Polaris por CG-EM.



APÊNDICE I

Figura 20: Cromatograma do óleo essencial de lúpulo H-Blanc por CG-EM.

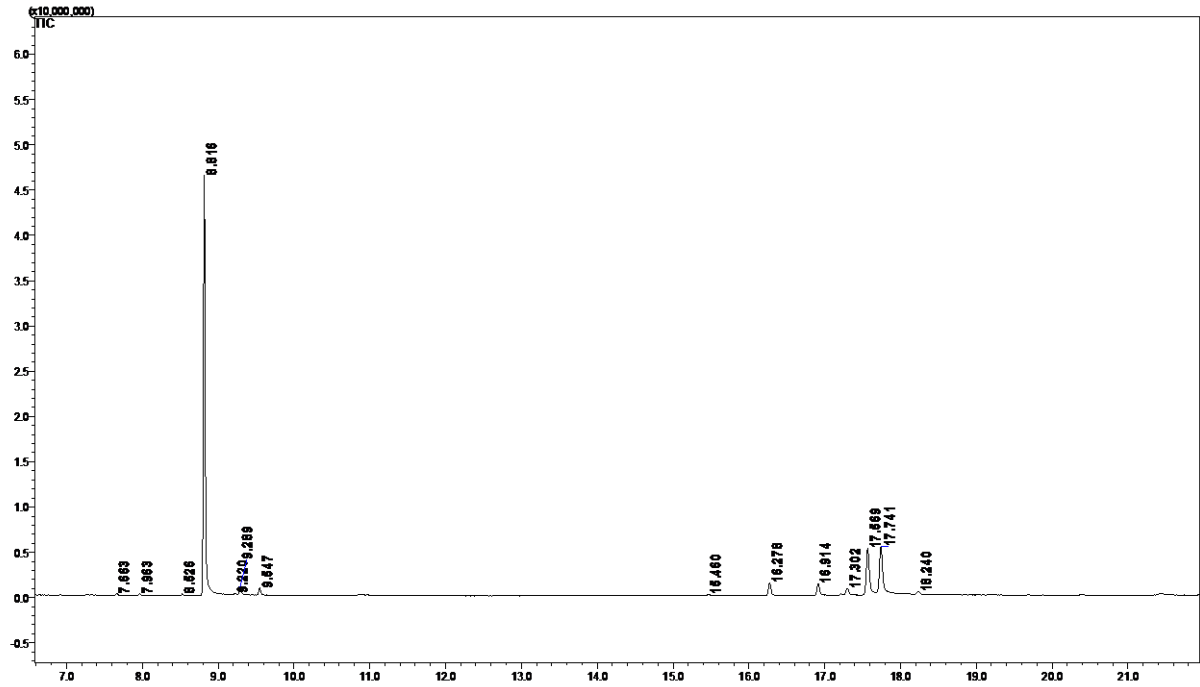


Figura 21: Cromatograma do óleo essencial de lúpulo Callista por CG-EM.

