



Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Química
Graduação em Química Industrial

Karinne Teixeira Gonçalves

**Extração, identificação e isomerização de alfa-ácidos em
Humulus lupulus L.**

Uberlândia-MG

2024

Karinne Teixeira Gonçalves

**Extração, identificação e isomerização de alfa-ácidos em
Humulus lupulus L.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Instituto de Química da
Universidade Federal De Uberlândia
como requisito para obtenção do título de
Bacharelado em Química Industrial.

Área de concentração: Química
Orgânica

Orientação: Prof.^a. Dra. Raquel Maria
Ferreira de Sousa

Uberlândia-MG

2024

Karinne Teixeira Gonçalves

Extração, identificação e isomerização de alfa-ácidos em *Humulus lupulus* L.

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado a Instituto de Química da
Universidade Federal De Uberlândia
como requisito para obtenção do título de
Bacharelado em Química Industrial.

Área de concentração: Química
Orgânica

Orientação: Prof^a. Dra. Raquel Maria
Ferreira de Sousa

Uberlândia, Minas Gerais, 26 de abril de 2024

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa (Orientadora-UFU)

Dra. Tiara da Costa Silva (UFU)

Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes (UFU)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Curso de Graduação em Química Industrial
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 1A, Sala 1A233 - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4103 - coqin@iqufu.ufu.br



ATA DE DEFESA - GRADUAÇÃO

Curso de Graduação em:	Química Industrial				
Defesa de:	Trabalho de Conclusão de Curso - GQB056				
Data:	26/04/2024	Hora de início:	14:00	Hora de encerramento:	16:30
Matrícula do Discente:	11911QID006				
Nome do Discente:	Karinne Teixeira Gonçalves				
Título do Trabalho:	Extração, identificação, separação e isomerização de alfa-ácidos de <i>Humulus lupulus</i> L.				
A carga horária curricular foi cumprida integralmente?	<input checked="" type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não				

Reuniu-se em sala virtual criada pela orientadora, utilizando a plataforma Google Meet (meet.google.com/sms-qwje-dsc), a Banca Examinadora, designada pelo Coordenador do Curso de Graduação em Química Industrial, assim composta: Prof.ª Dr.ª Raquel Maria Ferreira de Sousa - **Orientadora**; Dr.ª Tiara da Costa Silva - Titular; Prof. Dr. Marcos de Souza Gomes - Titular e Prof. Dr. Bruno Henrique Sacoman Torquato da Silva - Suplente.

Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa, Dr.ª Raquel Maria Ferreira de Sousa, apresentou a Comissão Examinadora e o(a) candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao(à) discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do(a) discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do curso.

A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

(X) Aprovado(a) Nota: 98 pontos
 () Reprovado(a)

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Maria Ferreira de Sousa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/04/2024, às 06:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcos de Souza Gomes, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/04/2024, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tiara da Costa Silva, Usuário Externo**, em 05/05/2024, às 18:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5344340** e o código CRC **C87B7037**.

AGRADECIMENTOS

A minha família, minha mãe Adiléia, meu pai Dasinho e minha irmã Kamila, e aos meus cachorros Puma e Guto, por todo o apoio ao longo dessa jornada.

Em especial a minha orientadora Profa. Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa, por todo o seu conhecimento, paciência, apoio e carinho, pela parceria no projeto.

Ao laboratório Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NuPPE) e as pessoas que fazem parte dele, pelo acolhimento, carinho e suporte ao longo da realização do projeto, e em especial agradeço a Diego Godina Prado e a Débora Machado Lima, pelas contribuições na realização deste trabalho.

A todos professores do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia que contribuiu na minha formação acadêmica.

Aos meus amigos que fiz ao longo da minha graduação, que me ajudou de mil formas possíveis, e que contribuiu para a melhor versão de mim mesma, sou imensamente grata a vocês.

Ao Dr. Mário Machado do Instituto de Biotecnologia da UFU pelas análises de espectrometria de massas e ao Dr. Flaysner Magayver Portela, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

A Rede de Laboratórios Multiusuário (RELAM/PROPP) da Universidade Federal de Uberlândia por fornecer o(s) equipamento(s) e suporte técnico para a realização dos experimentos

A FAPEMIG, CAPES e CNPq pelo auxílio financeiro na realização deste projeto.

RESUMO

A aplicação do lúpulo na cerveja confere um sabor amargo, aroma característico e estabilidade à cerveja. Com vários tipos de lúpulo cultivado, é possível criar uma grande variedade de cervejas. A cerveja, sendo uma das bebidas mais consumidas atualmente, possui um caráter social e econômico elevado. Visando formas mais sustentáveis em sua fabricação e produção, muitas pesquisas são feitas para melhorar a qualidade do produto. O plantio do lúpulo está se aprimorando para atender a uma demanda maior em sua utilização. Dessa forma, pesquisas estudam formas de cultivo para essa planta em outros climas ao redor do mundo, considerando que o clima ideal para o plantio do lúpulo é com estações do ano bem definidas. O manuseio do lúpulo é diversificado no setor industrial, sendo utilizado na área da saúde, cosméticos e alimentícia. No processo de fabricação da cerveja, o lúpulo é adicionado no final do processo de fervura e está associado ao amargor e à estabilidade da espuma. Quando adicionado na etapa de resfriamento da cerveja, passa a se associar ao aroma também. Os alfa-ácidos presentes no lúpulo são as classes de compostos que geram o amargor na bebida. Empresas renomadas do setor de análises químicas fabricam equipamentos específicos para a quantificação de iso-alfa-ácidos. Tal quantificação do amargor é dada em IBU (*International Bitterness Unit*), essa unidade nos diz o quanto amargo é a cerveja. No qual o seu valor é dado através de cálculos relacionados aos alfa-ácidos e ao seu processo de isomerização que ocorre na cerveja na etapa de aquecimento. O presente estudo tem como intuito isolar e isomerizar os alfa-ácidos, que são os componentes responsáveis do lúpulo por conferir o sabor amargo. Com isso, através de procedimentos como obtenção do extrato de lúpulo em solvente hexano, separação dos alfa-ácidos por precipitação e isomerização dos alfa-ácidos em aquecimento com solução tampão, foi possível alcançar resultados satisfatórios. Assim, as análises feitas por CLAE-EM, RMN ^{13}C e CCD no presente trabalho foram essenciais para caracterizar os alfa-ácidos e iso-alfa-ácidos por RMN ^{13}C , a fim de definir picos característicos que possibilitem a qualificação de amostras que contenham esses compostos.

Palavras chaves: Alfa-ácidos, Iso-alfa-ácidos, Isomerização, Lúpulo, RMN ^{13}C .

ABSTRACT

The application of hops to beer imparts a bitter flavor, characteristic aroma and stability to the beer. With several types of hops grown, it is possible to create a wide variety of beers. Beer, being one of the most consumed drinks today, has a high social and economic character. Aiming for more sustainable ways in its manufacturing and production, a lot of research is done to improve product quality. Hop planting is improving to meet a greater demand for its use. Therefore, research is studying ways of growing this plant in other climates around the world, considering that the ideal climate for planting hops is with well-defined seasons. The subject of hops is diverse in the industrial sector, being used in health, cosmetics and food. In the beer manufacturing process, hops are added at the end of the boiling process and are associated with bitterness and foam stability. When added during the beer cooling stage, it becomes associated with the aroma as well. The alpha-acids present in hops are the classes of compounds that generate bitterness in the drink. Renowned companies in the chemical analysis sector manufacture specific equipment for quantifying iso-alpha-acids. This quantification of bitterness is given in the IBU (International Bitterness Unit), this unit tells us how bitter the beer is. Its value is not given through calculations related to alpha-acids and their isomerization process that occurs in beer during the heating stage. The present study aims to isolate and isomerize alpha-acids, which are the components responsible in hops for imparting the bitter taste. Thus, through procedures such as obtaining hop extract in hexane solvent, separation of alpha-acids by supply and isomerization of alpha-acids when heated with an available solution, it was possible to achieve overwhelming results. Thus, according to the analyzes carried out by HPLC-EM, ^{13}C NMR and TLC in the present work were essential to characterize the alpha-acids and iso-alpha-acids by ^{13}C NMR, in order to define characteristic peaks that enable the qualification of samples that contain these compounds.

Keywords: Alpha-acids, Iso-alpha-acids, Isomerization, Hops, ^{13}C NMR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estruturas análogas de alfa-ácidos.	13
Figura 2	Gráfico do percentual de estabelecimentos por regiões no Brasil.	14
Figura 3	Reação de produção de etanol e gás carbônico através da fermentação da glicose	17
Figura 4	Etapas do processo de fabricação da cerveja	19
Figura 5	Resina da <i>Cannabis</i> e <i>Humulus</i> e suas diferença na estrutura química	20
Figura 6	Lúpulo e a glândula lupulina produzida pelo lúpulo	21
Figura 7	Estrutura dos principais alfa-ácidos no lúpulo	23
Figura 8	Mecanismo de isomerização do alfa-ácido	25
Figura 9	Estrutura dos principais betas-ácidos no lúpulo	26
Figura 10	Variedade de lúpulo HBC 682 e a sua embalagem	33
Figura 11	Esquema da obtenção do extrato de lúpulo	34
Figura 12	Procedimento de separação de alfa-ácidos de extrato de lúpulo	36
Figura 13	Procedimento de isomerização dos alfa-ácidos	37
Figura 14	Ilustração da análise do extrato de lúpulo em CCD	41
Figura 15	Cromatograma do extrato hexano de lúpulo e identificação dos compostos presentes	42
Figura 16	Espectro RMN ¹³ C do extrato hexano de lúpulo	46
Figura 17	Espectro de RMN ¹³ C de alfa-ácidos	47
Figura 18	Análogos de alfa-ácidos	47
Figura 19	Espectro RMN ¹³ C da amostra de iso-alfa-ácidos	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Teor de alfa e beta-ácidos em variedades de <i>H. lupulus</i>	28
Tabela 2	Gradiente da fase móvel utilizada no CLAE-QTOF-EM/EM	35
Tabela 3	Método de análise da composição por RMN	38
Tabela 4	Levantamento bibliográfico de metodologias de extração de alfa-ácidos de lúpulo	39
Tabela 5	Rendimento da extração	40
Tabela 6	Compostos identificado no extrato hexano de lúpulo	43
Tabela 7	Levantamento bibliográfico de metodologias de separação dos alfa-ácidos de extrato de lúpulo	44
Tabela 8	Dados de RMN ¹³ C do alfa-ácido e beta-ácido comparados com a literatura	45
Tabela 9	Dados RMN ¹³ C do alfa-ácidos comparados com a literatura	48
Tabela 10	Dados de ¹³ C na amostra isomerizada	50

LISTA DE ABREVIATÖES

α	Alfa-ácido
β	Beta-ácido
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- Espectometria de Massas
$CDCl_3$	Clorofórmio deuterado
CD_3OD	Metanol deuterado
EHL	Extrato Hexano de Lúpulo
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
IBU	International Bitterness United
m/z	Massa/carga
PIB	Produto Interno Bruto
ppm	partes por milhão
RF	Fator de Retençãõ
RMN	Ressonância Magnética Nuclear

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERERENCIAL TEÓRICO	16
2.1	Produção da cerveja	16
2.1.1	<i>Malteação</i>	16
2.1.2	<i>Brassagem</i>	17
2.1.3	<i>Fermentação</i>	17
2.1.4	<i>Maturação</i>	18
2.1.5	<i>Dry-hopping</i>	18
2.1.6	<i>Filtração</i>	19
2.1.7	<i>Envase</i>	19
2.2	Lúpulo	20
2.2.1	<i>Constituição química do lúpulo</i>	22
2.2.1.1	<i>Resinas macias</i>	22
2.2.1.2	<i>Alfa-ácidos</i>	22
2.2.1.3	<i>Betas-ácidos</i>	26
2.2.1.4	<i>Óleo essencial</i>	26
2.2.2	<i>Variedade de lúpulo</i>	27
2.2.3	<i>Lúpulo e a cerveja</i>	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivos gerais	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	MATERIAIS	31
4.1	Instrumentos	31
4.2	Reagentes e solventes	32
5	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	33
5.1	Umidade	33
5.2	Preparo do extrato	33
5.3	Prospecção fitoquímica do extrato	34
5.4	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-QTOF-EM/EM).	35
5.5	Separação dos alfa-ácidos a partir do extrato de lúpulo	36
5.6	Isomerização de alfa-ácidos	37
5.7	Análise da composição por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	38
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1	Extração de metabólito do lúpulo	39
6.2	Cromatografia em Camada Delgada	40
6.3	Análise da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas	41
6.4	Separação dos alfa-ácidos a partir do extrato de lúpulo	43

6.5	Análise de RMN ¹³C dos compostos presentes no extrato de lúpulo	45
6.5	Isomerização dos alfa-ácidos	49
7	CONCLUSÃO	51
8	REFERÊNCIAS	52

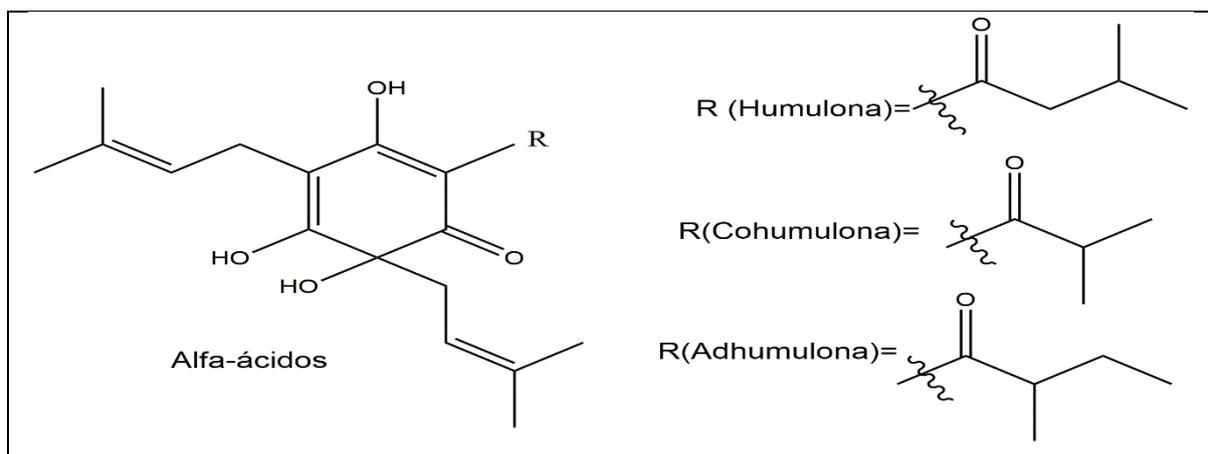
1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida aquosa fermentada a partir de açúcares proveniente do amido dos maltes. Com a expansão de tecnologias e de conhecimentos nos produtos naturais, temos a incorporação do *Humulus lupulus* (lúpulo) no processo de fabricação da cerveja (Klimczak; Cioch-Skoneczny, 2023). Porém, a aplicação do lúpulo não se restringe apenas na sua utilização em bebidas, além das suas característica sensoriais, essa espécie de planta apresenta também interessantes propriedades antibacteriana, anti-inflamatória e antioxidantes (Spósito *et al.*, 2019).

No *Humulus lupulus* são encontrados metabólitos especializados os quais são essenciais para o desenvolvimento da planta e suas aplicações na área da saúde e alimentícia. Seu local de plantio impacta significativamente no teor desses metabólitos. Devido a isso, é preferível que o cultivo seja em um local com climas Temperados (Durello; Silva; Bogusz, 2019).

A comercialização do lúpulo é usada principalmente para a fabricação da cerveja, onde ele irá contribuir para o aroma, sabor e estabilidade da espuma, sua adição é fundamental para que não se torne uma bebida adocicada. Os compostos responsáveis pelo amargor característico associado a cerveja são os alfa-ácidos (humulonas), que se diferencia em três estruturas análogas, Figura 1 (Cattoor *et al.*, 2013).

Figura 1. Estruturas análogas de alfa-ácidos.



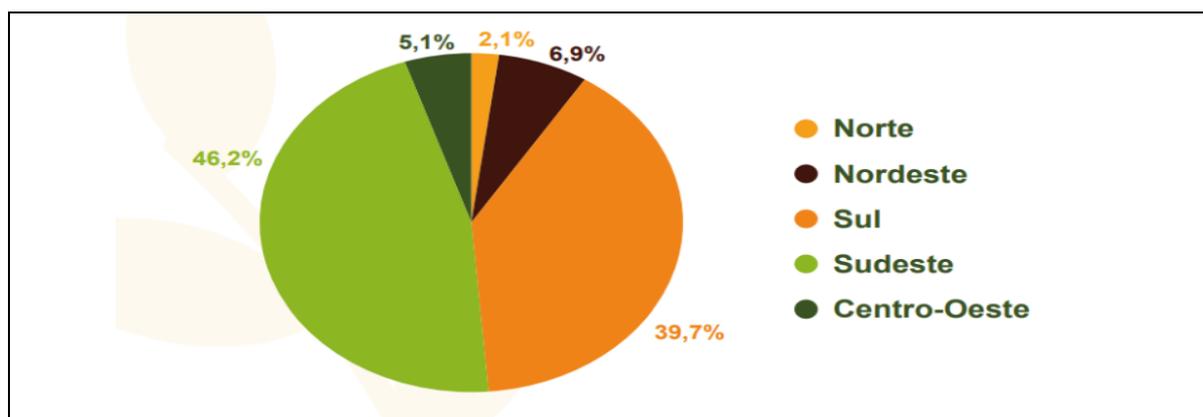
Fonte. A autora.

A cerveja é considerada a terceira bebida mais consumida mundialmente, o primeiro e segundo lugar vai para a água e o chá, respectivamente. Apresenta grande variedade entre as diversas empresas que a produzem, buscando aprimoramento de seus produtos para alcançar um maior público no mercado consumidor (Flaviis *et al.*, 2024).

O mercado cervejeiro vem crescendo a cada ano, em comparação com o ano de 2022. Em 2023, por exemplo, observou-se um crescimento de cerca de 11,6%, sendo relacionado com a abertura de novos estabelecimentos no Brasil. Com um novo recorde em 2023, Minas Gerais ocupa o terceiro lugar com 222 estabelecimentos abertos para a venda de cerveja, o primeiro lugar está São Paulo com 387 e em segundo lugar Santa Catarina com 310. A abertura de novos estabelecimentos para a comercialização da cerveja é um marco positivo para a economia, Figura 2 (ministério da agricultura e pecuária, 2023).

Dessa forma, é notável o crescimento do Brasil no setor cervejeiro no mundo, ocupando atualmente o terceiro lugar de produção de cerveja, perdendo para a China e Estados Unidos. Essa colocação conta com a presença de microcervejarias ou dos produtores de cerveja artesanal, que vem crescendo e ganhando mais espaço no mercado. Assim, contribuiu para a economia no país através de um aumento de 2% do PIB, como representa a Figura 2 (Filho; Silva; Castelo, 2020; Ministério da agricultura e pecuária, 2023).

Figura 2. Gráfico do percentual de estabelecimentos por regiões no Brasil.



Fonte. Anuário da cerveja (Ministério da Agricultura e Pecuária, 2023).

As microcervejarias desenvolvem produtos diferentes para atender uma demanda de pessoas que selecionam mais do que o sabor do produto que irão consumir, mas algo que esteja relacionado à cultura e identidade desses indivíduos. Cervejas artesanais são mais elaboradas, tanto no sabor como no aroma, o que implica em alto valor agregado (Dezordi; Vieira; Sausen, 2022; Filho; Silva; Castelo, 2020).

A importância do lúpulo em diversas variedades de cerveja, comerciais como a cerveja do tipo Large e IPA, está relacionada com o tipo de fermentação que ocorre nessa etapa. Há também a diferenciação dos subtipos de cervejas que estão relacionados com o teor alcoólico e o tratamento que a cevada recebe antes de se iniciar o mosto. Os subtipos de cervejas têm valores de IBU diferentes, como a American IPA, que tem o seu valor mínimo de IBU de 40 e o valor máximo de 70, a English IPA de 40 IBU a 60, e a Vienna Large, que tem o mínimo de 18 IBU e o valor máximo de 30, e a Czech Premium Pale Lager varia de 30 a 45 IBU (Cerveja, 2023; Rosa; Afonso, 2015)

A criação de um método padrão para a identificação dos compostos responsáveis pelo amargor torna-se uma iniciativa relevante, visando aprimorar a categorização dos distintos tipos de cerveja. Atualmente, a medição do amargor é realizada pelo Índice de Amargor Internacional (*International Bitterness Unit* - IBU), embora tal abordagem apresente suas limitações. A técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) constitui um método analítico que pode ser empregado na classificação de produtos com base em sua composição (Fagotti; Ribeiro, 2021; González Zorzano *et al.*, 2013)

Portanto, o objetivo deste estudo é criar um método para identificar os alfa-ácidos e iso-alfa-ácidos. Isso será feito através dos procedimentos de obtenção do extrato de lúpulo, utilizando CCD, CLAE-EM e RMN, esses métodos poderá ser aplicado para detectar a presença desses compostos em produtos fitoterápicos de lúpulo, bem como para classificar diferentes tipos de cervejas (Fagotti; Ribeiro, 2021; González Zorzano *et al.*, 2013).

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Produção de cerveja

No processo de produção da cerveja são necessários quatro ingredientes essenciais para a sua fabricação, sendo elas: o malte, a levedura, o lúpulo e a água. A cerveja é considerada uma bebida fermenta devido a adição do malte e da levedura, fazendo com que ocorra a fermentação. A escolha dos ingredientes é importante para assegurar uma boa qualidade ao produto final (Coelho Neto *et al.*, 2020).

O processo de fabricação da cerveja passa por etapas de aquecimento e resfriamento, onde é dividida em cinco etapas, como a malteação, a brasagem, fermentação e maturação, filtração e envasamento. Nessas etapas para garantir uma maior qualidade ao consumidor toda as etapas passam por um controle de qualidade, como análises sensoriais, físico-químicas, microbiológicas e entre outros e também durante esse processo é feita de forma automatizada (Rosa; Afonso, 2015).

2.1.1 Malteação

A malteação ocorre com a colheita dos grãos de cevadas, após a colheita eles são secados e estocados a uma umidade de 10 a 13%, em seguida ele é levado para a maceração dos grãos, onde começa o processo de malteação. Na maceração são adicionados água nos grãos até se chegar a uma umidade de 43 a 46% por 7 dias, onde ocorre o processo de crescimento dos embriões, nessa etapa ocorre uma modificação nas estruturas físico-químicas dos grãos, com a produção e modificação das enzimas. Em seguida, ocorre a secagem desses grãos para a umidade de 5%, para poder ocorrer a inibição da atividade enzimática (MacLeod; Evans, 2015; Muzzolon *et al.*, 2021).

2.1.2 Brassagem

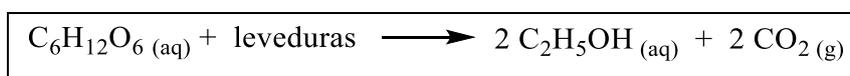
A brassagem é caracterizada como a junção da água com o malte, onde o malte rico em amido, gera um líquido doce onde tem-se a obtenção do mosto. O mosto é produzido com a moagem do malte e dos ingredientes que podem ser adicionados a esse processo, como trigos e outros cereais, devido a isso ocorre a quebra das cascas dos grãos e tem a liberação do endosperma amiláceo (amido) (Rosa; Afonso, 2015).

A seguir tem-se a filtração para que tenha a separação da casca dos grãos com o restante do líquido, assim em seguida tem-se o aquecimento do mosto a uma temperatura de 72 a 100 °C durante 30 a 90 minutos, dessa maneira ocorre a realização da transformação do amido em glicose, nessa etapa ocorre a adição do lúpulo, que proporciona o sabor amargo característico das cervejas, com a alta temperatura alguns compostos que está presente da composição do lúpulo se degrada. Posteriormente todo o líquido é resfriado de 8 a 22 °C e ocorre a aeração, na presença de oxigênio, para preparar todo o mosto para a introdução das leveduras (Muxel, 2022).

2.1.3 Fermentação

A fermentação ocorre em tanques que são denominados fermentadores, onde ficam de repouso de 1 a 4 dias a uma variação de temperatura de 8 a 22 °C dependendo da cerveja que se quer produzir. As leveduras irão consumir a glicose presente no líquido, deste modo será produzido dois produtos principais de interesse, durante o consumo da glicose, que são etanol e gás carbônico, como mostra na Figura 3 (Hinojosa-Avila *et al.*, 2024).

Figura 3. Reação de produção de etanol e gás carbônico através da fermentação da glicose.



Fonte. A autora.

Nessa etapa são utilizadas duas espécies do gênero *Saccharomyces*, que pertence à família *Saccharomycetaceae*. Para a fabricação de cerveja com baixa fermentação como a cerveja do tipo Large, utiliza-se a levedura *Saccharomyces pastorianus*, que sua espécie tende a permanecer na parte inferior no tanque de fermentação, e para a produção de cerveja que contém a alta fermentação que é do tipo Ale, usa-se a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, onde sua fermentação ocorre na parte superior nos tanques de fermentação (Bortoli, 2013; Hinojosa-Avila *et al.*, 2024).

2.1.4 Maturação

A maturação é considerada o meio no qual os sabores e aromas serão incorporados no líquido, de modo que tenha a obtenção da cerveja, nesse processo o líquido ficará em descanso livre de oxigênio por 6 a 30 dias a uma temperatura de 0 °C, dessa maneira tem a decantação da grande maioria das leveduras, ocorrendo a separação. Devido ao abaixamento de temperatura, essa etapa também é considerada uma fermentação secundária, onde a glicose residual e as leveduras ativas e pouco presente, ainda realizara o processo de produção de etanol e gás carbônico, assim terá o ajuste de teor de gás carbônico no produto final (Muxel, 2022; Souza; Carvalho, 2022).

2.1.5 Dry-hopping

Na fase de maturação há um método denominado como dry-hopping, método no qual se adiciona o lúpulo ou extrato de lúpulo, na fase fria de todo o procedimento. A adição tardia do lúpulo, logo após ao processo de fermentação, faz com ocorra a intensificação do aroma, preservando assim os compostos voláteis presentes no lúpulo. A presença de etanol nesse meio faz com que os compostos dos óleos voláteis do lúpulo permaneçam presente na bebida aumentando sua concentração na cerveja (Mikyška *et al.*, 2023).

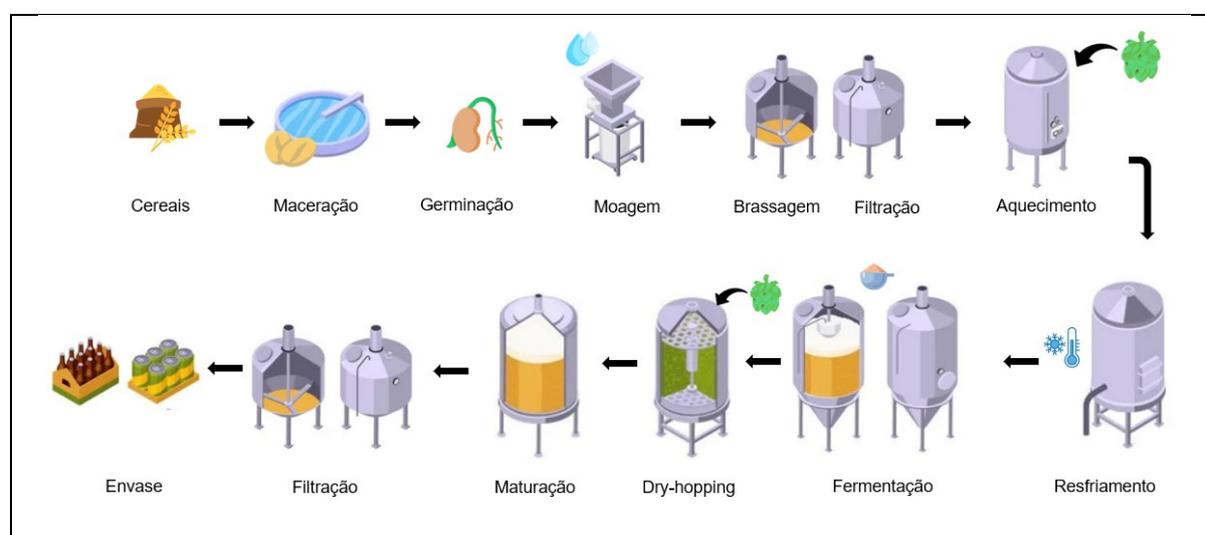
2.1. 6 Filtração

A filtração tem como objetivo deixar a bebida limpa partículas que podem estar presente e remover as leveduras, todo o processo é feito sem alterar o sabor, e as propriedades físico-químicas da bebida transparente e com brilho. Algumas cervejarias optam por utilizar de centrifugadores para essa etapa, de modo que a bebida fica de 1 a 2 horas nesse processo (Alves *et al.*, 2020).

2.1.7 Envase

O envase é a última etapa que da cerveja pronta, para que chegue até o consumidor, onde será escolhido o tipo de recipiente em que se deseja colocar a bebida pronta para consumo. Várias cervejarias e microcervejarias tendem a criar uma embalagem que retrata a sua marca e que mantém a qualidade da cerveja, principalmente a cor e o seu sabor. As embalagens normalmente utilizadas são alumínio, garrafas de vidro e barris, mas nos últimos anos tem se juntado esforços para que consiga ter uma diminuição dessas embalagens no meio ambiente (Paternoster *et al.*, 2017).

Figura 4. Etapas do processo de fabricação da cerveja.

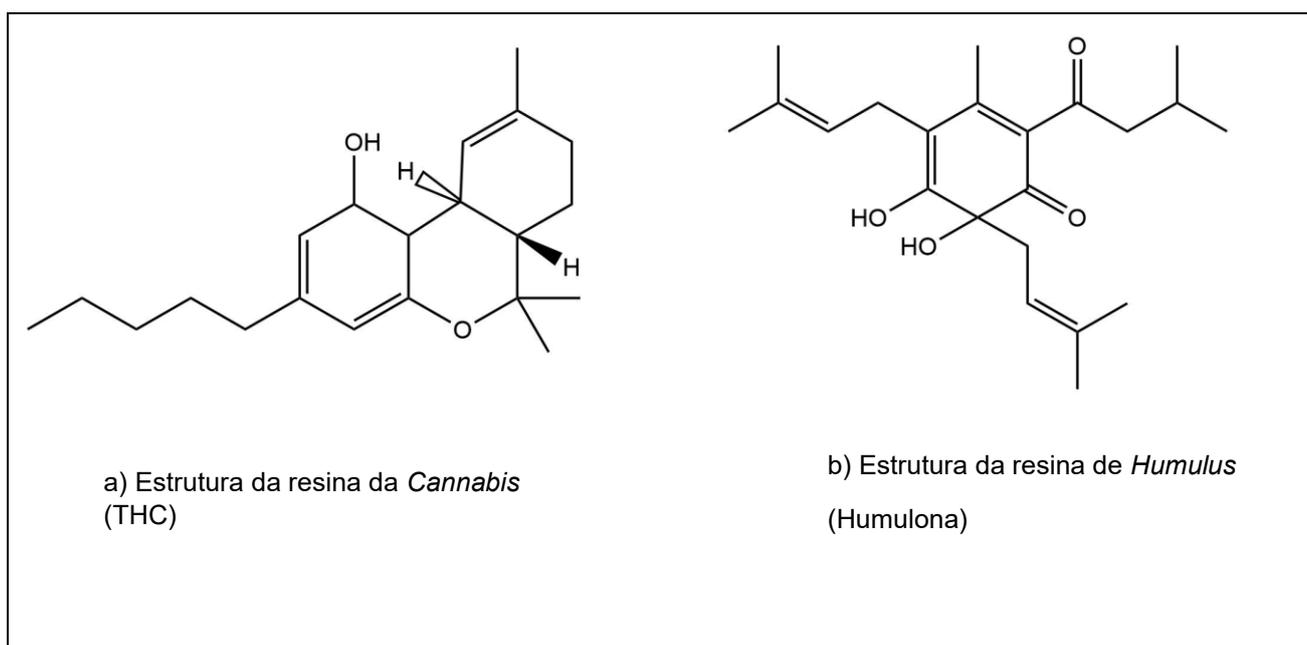


Fonte. A autora.

2.2 LÚPULO

O nome científico do lúpulo é *Humulus lupulus* Linnaeus, que é da ordem das Rosales e à família é a Cannabaceae, onde vincula se dois gêneros, *Cannabis* e *Humulus*, apesar de pertencerem a mesma família as resinas que são secretadas por esses gêneros são diferentes, tendo característica químicas e estrutura diferentes. O *Humulus* secreta uma resina que possui o gosto amargo, enquanto a *Cannabis* produz e secreta uma resina alucinógena (Durello; Silva; Bogusz, 2019; Muxel, 2022).

Figura 5. Resina da *Cannabis* e *Humulus* e suas diferença na estrutura química.



Fonte. A autora.

O gênero *Humulus* têm três espécies (*Humulus lupulus*, *Humulus japonicus* e *Humulus yunnanensis*) que são encontradas em regiões com climas temperados. Dentre elas, somente *H.lupulus* e *H. japonicus* são utilizadas comercialmente, por apresentar uma maior produção de resinas (Durello; Silva; Bogusz, 2019).

O *Humulus* é uma planta trepadeira, considerada com ciclo de vida longo podendo chegar a 50 anos, mas para fins comerciais é renovada entre 10 a 20 anos, a planta produz flores com sexo distintos, é também polinizada pelo vento, e que cresce em climas temperados, que tem suas estações do ano divididas, e se

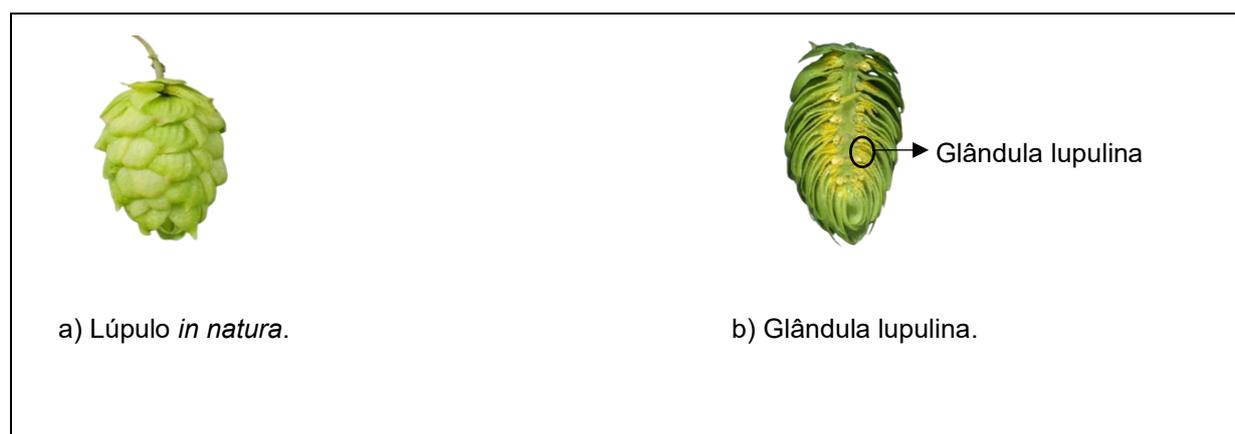
desenvolve em latitudes de 35° N e 55° N. As plantas de *Humulus* tem uma raiz que cresce cerca de 12 a 15 cm no solo, e tem um sistema radicular forte, possui um segmento aéreo bastante desenvolvido (Mendes Fagherazzi *et al.*, 2017).

É na parte aérea da planta que são produzidas as flores de lúpulos, que sendo uma planta dioica, tem sexos produzidos separados nas flores, as flores masculinas se diferenciam por ter pouca glândula lupulina e ter o diâmetro maior, as flores femininas têm uma quantidade maior de glândulas lupulinas e tem seu diâmetro menor chegando a ser 4-3 milímetros. Para a fabricação de cervejas usam somente os cones femininos por terem mais glândulas femininas, onde são produzidas as resinas do lúpulo (Hoek; Hermans-Lokkerbol; Verpoorte, 2001; Sawicka *et al.*, 2021).

A melhor fase da estação do ano para a colheita dos cones femininos (inflorescência feminina não fertilizada) é no fim do verão e início de outono, onde os cones não evoluem para a formação do fruto, que é um amendoim característico da espécie, vale ressaltar que para a produção de cerveja é necessário que não tem a *transformação* da semente no interior das flores femininas, para que tenha um maior teor de metabólicos especializados (Almaguer *et al.*, 2014).

Para a produção de cerveja utiliza-se, somente flores femininas. Nos cones femininos encontramos as glândulas lupulinas na superfície interior das folhas dos lúpulos, que tem como característica um pó amarelo, aderente de aroma semelhante ao da cerveja. Para uma maior produção dessa glândula depende da variedade do lúpulo e da sua área de plantação, que tem condições climáticas apropriada para seu crescimento (Sawicka *et al.*, 2021).

Figura 6. Lúpulo e a glândula lupulina produzida pelo lúpulo.



Fonte. Modificado de BioDiversity (Lúpulo, 2020)

2.2.1 Constituição química do lúpulo

As glândulas lupulinas são a parte de maior interesse no mercado, isso devido a formação de metabólitos especializados nos cones dos lúpulos, que são as resinas totais e outros componentes. As composições químicas presentes no lúpulo, podem ser classificadas como duras e macias, polifenóis, proteínas, celulose, óleo essencial, e entre outros. A classificação das resinas se dá através da solubilidade em solventes orgânicos, sendo eles metanol, éter etílico e hexano. As resinas macias têm cerca de 10 a 25% de massa proveniente do lúpulo e as resinas duras têm 3 a 5% (Abiko; Paudel; Uehara, 2022; Durello; Silva; Bogusz, 2019).

Os lúpulos têm suas composições determinadas após a secagem pois, quando recém coletados, apresentam cerca de 75% de teor de água na sua composição. Para a indústria cervejeira, o valor é agregado ao lúpulo é em função dos compostos que têm o sabor amargo encontrados nas resinas lupulinas, e os óleos essenciais também são importantes pois agregam aroma a bebida (Chiancone *et al.*, 2023).

2.2.1.1 Resinas macias

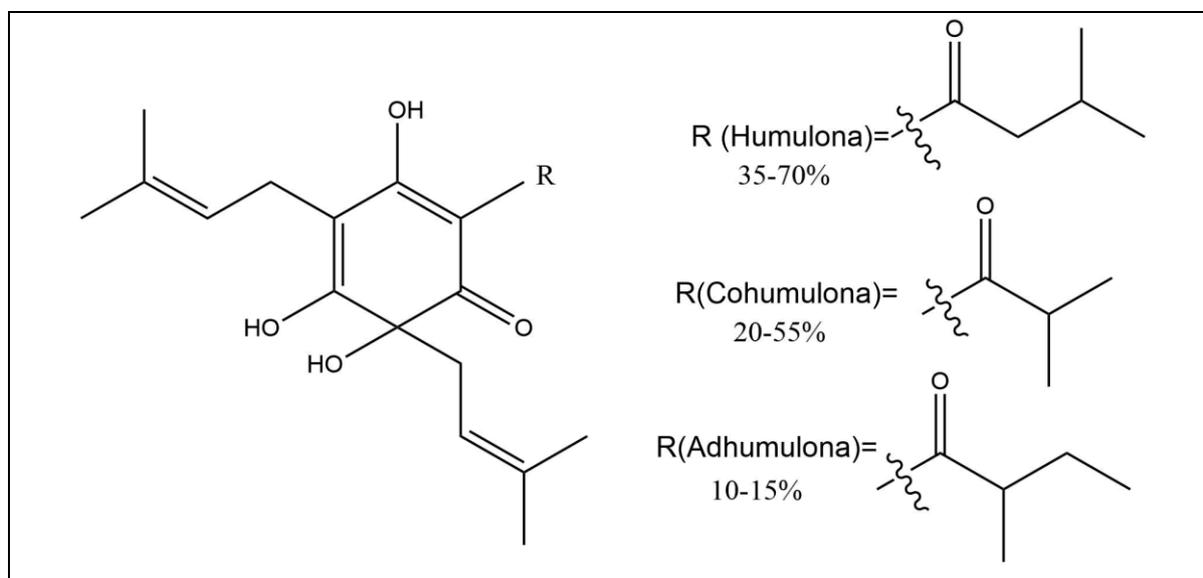
A resina macia é composta por uma fração α e uma fração β , na fração alfa encontramos o principal composto de interesse na indústria cervejeira, que é o α -ácidos, o qual contribui com o amargor, aroma e estabilidade na cerveja. A introdução do lúpulo na cerveja caracteriza o sabor amargo da mesma, sem ela a cerveja considerada uma bebida doce, devido aos açúcares residuais do malte, que é um dos ingredientes usados na fabricação da cerveja (Travis *et al.*, 2008; Young; Oakley; Fox, 2023).

2.2.1.2 Alfa-ácidos

Os alfa-ácidos são compostos por três análogos principais que se diferenciam no seu substituinte lateral. A humulona compõe 35 a 70% do total de alfa-ácidos no lúpulo seguido da cohumulona com 20 a 55% e adhumulona de 10 a 15%, essa variação depende da localidade e da variedade do lúpulo cultivado. Existem outros

três análogos de alfa-ácidos no lúpulo, mas esses têm apenas traços na composição química do lúpulo, são eles poshumulona, prehumulona e adprehumulona (Karabín *et al.*, 2016).

Figura 7. Estrutura dos principais alfa-ácidos e suas porcentagens na resina macia do lúpulo.



Fonte. A autora.

Como mencionado anteriormente, os alfa-ácidos são responsáveis pelo amargor na cerveja, no entanto, eles não são totalmente solúveis em água. É necessário que eles passem por um processo de isomerização em sua estrutura para se tornarem mais solúveis em água. Na literatura, verificou-se que em diferentes pHs em soluções aquosas a solubilidade dos iso-alfa-ácidos é maior em comparação com os alfa-ácidos (Biendl *et al.*, 2014).

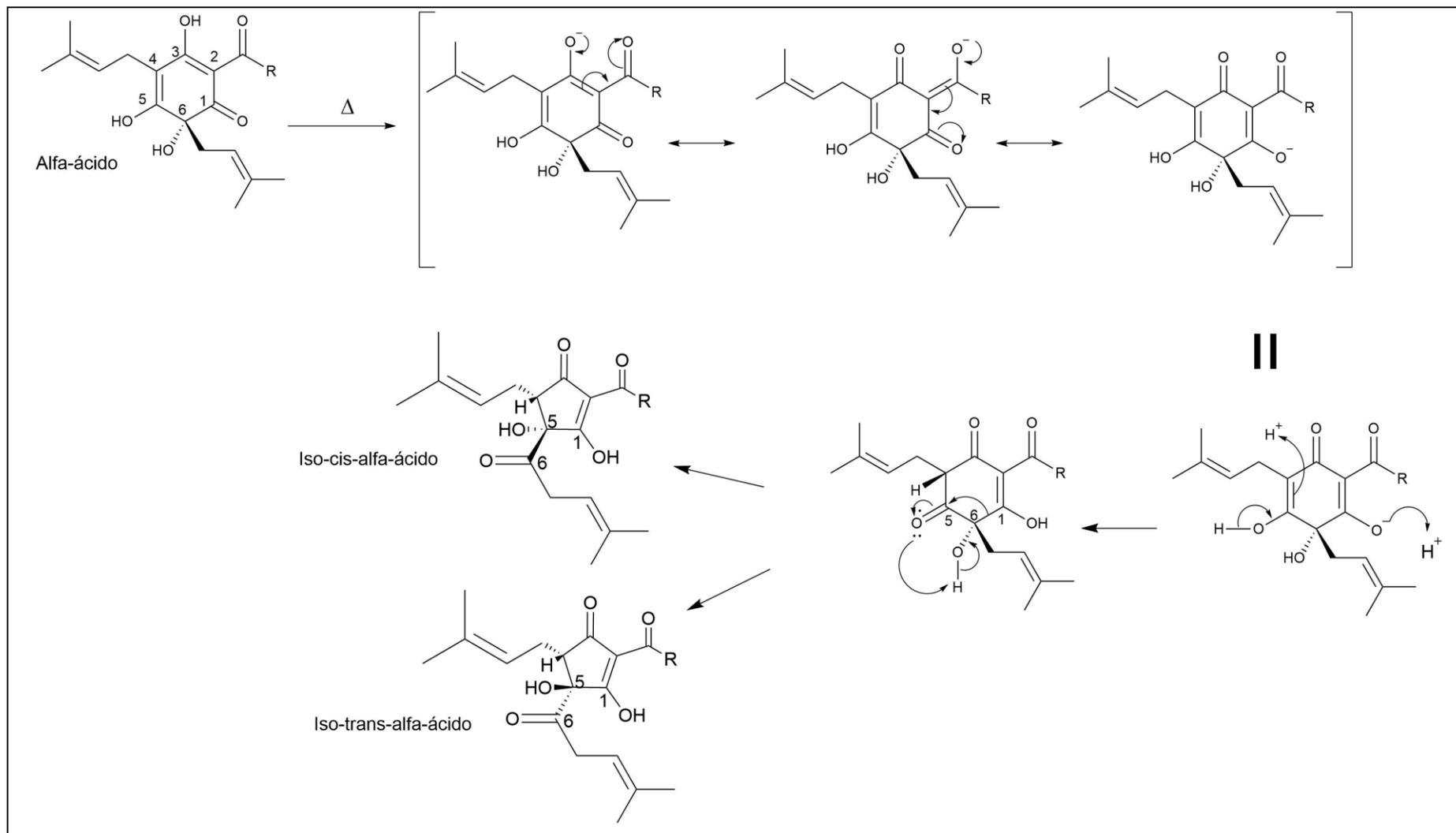
Por exemplo, em pH igual a 4,2, a solubilidade do alfa-ácido é menor que 2 mg/mL, enquanto a do iso-alfa-ácido é de 500 mg/mL. Em pH 5,2, a solubilidade do alfa-ácido é de 84 mg/mL e a dos iso-alfa-ácidos é de 2.400 mg/mL (Biendl *et al.*, 2014).

As moléculas de alfa-ácidos advindas do lúpulo adicionado no processo de fabricação da cerveja não se transformam totalmente em iso-alfa-ácidos, mas pouco do que é transformado contribui significativamente para o amargor da bebida, visto que o sabor amargor se intensifica (Durello; Silva; Bogusz, 2019; Štěřba; Punčochář; Brányik, 2024).

A isomerização que ocorre nos alfa-ácidos do lúpulo é capaz de produzir derivados dos três alfa-ácidos importantes. Cada alfa-ácido produz duas moléculas de iso-alfa-ácidos sendo ele diastereoisômeros, como *cis* e *trans*, totalizando no final de cada isomerização 6 compostos de iso-alfa-ácido. A isomerização se dá pelo aquecimento, a temperatura ideal de isomerização é de 100 °C, no tempo de por 60 a 90 minutos, dependendo do tipo de cerveja a ser produzida (Almaguer *et al.*, 2014).

Durante a isomerização do alfa-ácido do lúpulo, o *cis* e o *trans*-iso-alfa-ácidos são produzidos, e o que irá estabelecer em qual posição que se encontra depois da contração do anel por uma reação acioloína, é a posição espacial do grupo OH, que estará ligado no carbono C5 que estará vinculado ao carbono C6 que terá um grupo isoprenil como substituinte (Muxel, 2022).

Figura 8. Mecanismo de isomerização do alfa-ácido.

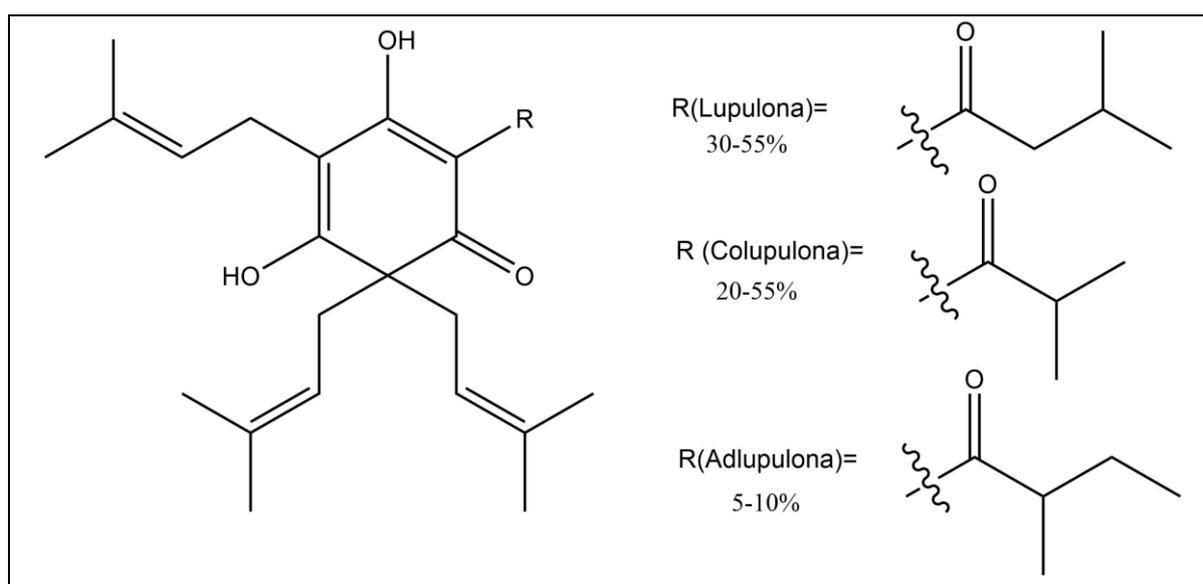


Fonte. A autora.

2.2.1.3 Beta-ácido

Os betas-ácidos são similares aos alfa-ácidos, com uma diferenciação que no C6 tem se a substituição do grupo OH, por um substituinte prenila, tal substituição muda a estrutura da molécula como também suas propriedades físico-químicas. Eles são formados por cinco análogos de beta-ácidos com concentrações diferentes, sendo eles a lupulona com 30 a 55%, colupulona com 20 a 55%, adlupulona com 5 a 10% e contém traços de prelupulona e poslupulona (Karabín *et al.*, 2016; Keukeleire, 2000; Muxel, 2022) .

Figura 9. Estrutura dos principais betas-ácidos no lúpulo.



Fonte. A autora.

O beta-ácido é extremamente insolúvel em solução aquosa portanto, a presença desse composto no lúpulo se torna irrelevante, visto que ele não se solubiliza no mosto, e que em dada etapa do processo cervejeiro ele é removido quase totalmente por filtração. A presença de pequenas concentrações de beta-ácidos na cerveja contribui para a conservação da bebida, devido a sua atividade antioxidante (Briggs *et al.*, 2004; Chiancone *et al.*, 2023).

2.2.1.4 Óleo essencial

O óleo essencial do lúpulo contém uma gama de variedade de compostos em sua composição química, o que contribui para uma extensa variedade de

propriedades físico-químicas e suas aplicações, contendo em sua totalidade cerca de 0,5 a 3% nas variedades de lúpulo *in natura*. Os óleos essenciais são compostos extremamente voláteis e que, se submetidos a altas temperaturas, podem se oxidar e evaporar. Além disso, são substâncias hidrofóbicas, com quase nenhuma interação com o meio aquoso (Mikyška *et al.*, 2023; Paguet *et al.*, 2024) .

No processo cervejeiro, os óleos essenciais contribuem com o aroma e outras atividades biológicas. A adição do lúpulo nesse processo é feita pelo “*dry hopping*” denominados de lupulagem tardia. Os compostos do óleo essencial do lúpulo são separados em três grupos: monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarbonetos alifáticos. Aqueles que são oxigenados apresentam os seguintes grupos funcionais: álcoois, aldeídos ácidos, cetonas, epóxidos e ésteres. Aqueles que apresentam grupos funcionais de enxofre apresentam: tio ésteres, sulfetos e outros organosulfurados (Bocquet *et al.*, 2018-; Chiancone *et al.*, 2023).

2.2.2. Variedades de lúpulos

Existe uma grande variedade de lúpulo no mundo em que, somente no ano de 2021, 298 espécies variedades foram registradas no mundo. No Brasil já foram identificadas 48 variedades. Elas se diferenciam devido aos seus metabólitos especializados. A sua principal diferenciação é em função das concentrações de óleos essenciais e de alfa e beta-ácidos em cada variedade de lúpulo. Contudo, as variações das concentrações dos metabólitos especializados do lúpulo, podem mudar de acordo com a localidade de cultivo e a idade da planta, como mostra a Tabela a seguir, com diferentes tipos de lúpulo em quatro países diferentes (Contin *et al.*, 2023; Lúpulo, 2018; Mendes Fagherazzi *et al.*, 2017).

Tabela 1. Teor de alfa e beta-ácidos em variedades de *H. lupulus*.

Variedades de lúpulo				
País	Variante de lúpulo.	α -ácidos (%)	β -ácidos (%)	Referência
Reino Unido	Challenger	5,0 – 9,0	3,0 - 4,0	(Mendes Fagherazzi <i>et al.</i> , 2017)
	Phoenix	8,0 – 12,0	4,0 – 5,5	
	Fuggle	3,0 – 6,0	2,0 – 3,0	
Estados Unidos da América	Cascade	4,5 – 7,0	2,0 -3,0	
	Centennial	9,5 – 11,5	3,5 – 4,5	
	Columbus	15,0 – 17,0	4,5 – 5,0	
	Chinnok	10,0 – 14,0	3,5 – 5,5	
Alemanha	Hallertau	3,5 – 5,5	4,5 – 5,0	
República Tcheca	Saaz	2,5 – 4,5	4,0 – 6,0	

Fonte: a autora.

A biossíntese dos metabólitos especializados de plantas estão sujeitos fatores climáticos, por isso, o clima de melhor adaptação do lúpulo para melhores rendimentos nos compostos de interesse é o temperado. Deste modo, sendo o Brasil o 3º fabricante de cerveja e localizado em um país com o clima tropical e subtropical, na fabricação de cerveja o país importa grandes quantidades de lúpulo por ano, de países que lideram a produção de lúpulo que é os Estados Unidos e a Alemanha, devido ao clima temperado da região (Barreto; Pilau, 2023).

No Brasil há algumas complicações para o cultivo de lúpulo devido ao clima, pois climas tropicais desfavorecem a qualidade do lúpulo, sendo ele submetidos a altas temperaturas. Desse modo, o plantio do lúpulo em climas tropicais e subtropicais levou ao desenvolvimento de plantas que conseguem se desenvolver nesse meio ao alterar seu genótipo, em função ao recente interesse por essas localidades, no clima tropical ainda não se têm dados que comprovam a eficácia do plantio, por outro lado em climas subtropicais tem resultados promissores em relação ao lúpulo que é desenvolvido nesse meio (Barreto; Pilau, 2023; De-Souza *et al.*, 2022).

2.2.3 Lúpulo e cerveja

O amargor da cerveja é classificado pela língua inglesa como IBU (*International Bitterness Units*), que em português é traduzido como Unidade Internacional de Amargor, e é usado apenas para classificar o nível de amargor da cerveja e está relacionado ao teor de iso-alfa-ácidos. Atualmente na escala do IBU os níveis variam de 1 a 100 em que 1 mg de iso-alfa-ácidos L⁻¹ corresponde a 1 IBU (Daniel, 2000). O método padrão para se estimar o amargor em cerveja utiliza a detecção dos iso- α -ácidos totais por técnicas espectrofotométricas, após sua extração por solventes, expressando sua concentração IBU (JASKULA et al., 2008).

O pH e a reação de isomerização durante o aquecimento do mosto é fundamental para elevar a taxa de solubilização dos iso-alfa-ácidos no mosto, visto que somente cerca de 30% dos alfa-ácidos que são isomerizados está dissolvido no mosto, após a reação completa. Para o cálculo de IBU considera-se esses fatores e a dosagem de alfa-ácidos que é adicionado no processo de fabricação da cerveja (Daniel, 2000; Durello; Silva; Bogusz, 2019).

De acordo com Durello (2019), para a realização do cálculo mencionado acima, necessita-se conhecer a taxa de utilização do lúpulo, em que se aplica o Fator Bigness pelo Fator tempo de aquecimento do mosto, como demonstra a Equação 1. Para cada indústria a taxa de utilizada é ajustada devido ao equipamento que é utilizado durante a produção da cerveja (Durello; Silva; Bogusz, 2019).

$$\text{Taxa de utilização} = \text{Fator de Bigness} \times \text{Fator tempo de aquecimento} \quad \text{Equação 1}$$

Para o cálculo da dosagem de alfa-ácidos adicionado no processo, emprega-se a Equação 2, que tem relação com a massa de lúpulo que é inserida e o volume do mosto que é operado pelo equipamento, assim adquirindo a dosagem correta de alfa-ácidos, para a determinação do IBU que é feita pela Equação 3 (Durello; Silva; Bogusz, 2019).

$$\left(\frac{\text{mg L}^{-1} \text{ humulonas}}{\text{adicionadas}} \right) = \frac{\left(\frac{\text{quantidades de}}{\text{humulonas}} \right) \times \left(\frac{\text{massa de}}{\text{lúpulo (g)}} \right)}{\text{Volume do mosto (L)}} \times 1000 \quad \text{Equação 2}$$

$$IBU = \text{Taxa de utilização} \times \text{mg L}^{-1} \text{ de humulonas adicionadas}$$

Equação 3

Como será visto posteriormente, os alfa-ácidos ao serem isomerizados tem o surgimento de isômeros *cis* e *trans*, que tem a contribuição relativa quanto ao amargor, para as frações *cis* a intensidade do amargor é maior que a atribuição da intensidade dos isômeros *trans*. Segundo Schönberger (2008), possui uma ordem de intensidade de amargor sendo ela: *cis*-isohumulona > *trans*-isohumulona > *cis*-isocohumulona > *trans*-isocohumulona (Schönberger, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Isolar e identificar uma fração de alfa-ácidos de extrato de lúpulo e isomerizar esses compostos, os quais são responsáveis pelo amargor da cerveja, e desenvolver um método de análise desses compostos por Ressonância Magnética Nuclear para futura aplicação em amostras com misturas complexas como fitoterápicos e classificação de cervejas.

3.2 Objetivos específicos

- Obter extrato do lúpulo.
- Realizar a separação dos componentes principais do extrato de lúpulo, sendo eles os alfa-ácidos e os betas-ácidos.
- Executar a isomerização de alfa-ácidos.
- Caracterização dos compostos isolados utilizando Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a

Espectrometria de Massas (CLAE-EM) e Cromatografia em Camada Delgada (CCD).

4 MATERIAIS

4.1 INSTRUMENTOS:

- balança analítica SHIMADZU modelo AUW 220V;
- balança analítica BEL ENGENIEERRIG;
- manta aquecedora FISATOM modelo 202;
- balança de luz infravermelha para determinação de umidade QUIMIS modelo Keft FD-600;
- evaporador rotativo IKA modelo RV 10 como banho e aquecimento e controle de temperatura;
- liofilizador TERRONI modelo LS3000;
- cromatografia em camada delgada;
 - sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV 254 nm), 0,20 mm de espessura, MACHEREY-NAGEL;
 - sílica gel 60 sem indicador de fluorescência, 0,20 mm de espessura, MERCK KGA;
- cromatógrafo líquido da marca Agilente modelo Infinity 1260, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução, do tipo Q-TOF, da Agilent no modelo 6520B.
- Ressonância Magnética Nuclear da marca BRUKER no modelo Ascend 400.

4.2 REAGENTES E SOLVENTES

- Os solventes utilizados durante os procedimentos foram: hexano, acetato de etila, éter-etílico, para uma maior pureza os solventes orgânicos foram previamente destilados, para aumentar o grau de pureza, metanol (Grau HPLC), etanol, metanol, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, ácido acético glacial e clorofórmio deuterado. Os solventes utilizados que estava disponível em laboratório, assim sendo MERCK, SYNTH E VETEC.
- Os reagentes utilizados durante as metodologias empregadas foram: acetato de chumbo (Dinâmica, CAS N^o: 1335-32-6, PM: 807,72), carbonato de sódio (NEON, CAS N^o: 497-19-8, PM: 105,99), sulfato e magnésio anidro (MERCK, CAS N^o: 7487-88-9, PM: 120,37), anisaldeído (VETEC, CAS N^o: 123-11-5, PM: 136,15).

5 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Umidade

O teor de umidade do material vegetal do lúpulo foi medido pela balança de luz infravermelha, e a análise foi realizada com 1,0 g do material vegetal em uma temperatura de 105 ± 5 °C, para uma umidade de aproximadamente 10%. A medição foi realizada em triplicata.

5.2 Preparo do extrato de lúpulo

O material vegetal utilizado para o preparo do extrato de lúpulo foi adquirido em formato de *pellets*, com o maior teor de alfa-ácidos em relação aos betas-ácidos, presentes no lúpulo. O material vegetal foi triturado e colocado em um balão de fundo redondo de 1L, com o volume de hexano no total de 470 mL para 47,00 g de *pellets* de lúpulo da marca YAKIMA CHIEF HOP, que tem a variedade HBC 682.

Figura 10. Variedade de lúpulo HBC 682 e a sua embalagem.

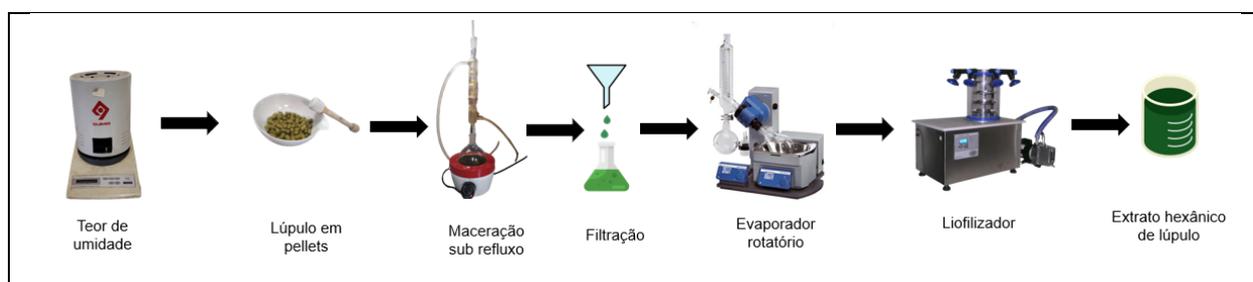


Fonte. A autora.

Para obter o extrato de lúpulo, realizou um processo de refluxo, montou-se um sistema que consistia de uma manta aquecedora conectada a um condensador do tipo "allinh" (com bolas). Realizando duas horas de maceração sob refluxo com aquecimento, seguida pela filtração dos resíduos sólidos. O material filtrado foi coletado, e o solvente presente na solução do extrato foi evaporado usando um evaporador rotatório (Rapinel *et al.*, 2020).

Assim o Extrato Hexano de Lúpulo (EHL) foi armazenado no congelador totalmente vedado por 24 horas e seguidamente o material foi liofilizado, para a garantia de retirada de todo o solvente que pudesse estar presente. Após o extrato obtido foi mantido no congelador com total vedação.

Figura 11. Esquema da obtenção do extrato de lúpulo.



Fonte. A autora.

5.3 Prospecção fitoquímica do extrato

Afim de avaliar a mistura de compostos presente no EHL, foi empregado a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) juntamente com um revelador colorimétrico. Para a análise do extrato, preparou-se uma solução com metanol e EHL com a concentração de 1 mg/mL. Utilizou a camada delgada de sílica de gel (60G) com indicador de fluorescência, onde aplicou a solução de extrato em metanol, e como fase móvel uma mistura de hexano: acetato de etila (7:3).

Para a análise da CCD, borrifou-se o revelador de anisaldeído que tem a capacidade de revelar uma variedade de grupos de metabólitos especializados, e a CCD foi aquecida a uma temperatura em torno de 100 °C durante 2 minutos, para que fosse revelada. Assim, preparou-se uma solução de anisaldeído em ácido sulfúrico, onde apresentava 0,50 mL de anisaldeído em 10 mL de ácido acético glacial, e em

seguida acrescentou-se 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico, seguindo essa ordem (Wagner; Bladt, 1996).

5.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLAE-QTOF-EM/EM).

O EHL foi submetido a uma cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com fonte de ionização por electrospray em modo negativo, no qual a amostra a ser injetada foi preparada em metanol com grau HPLC, com 5 mg/mL do EHL, onde foi previamente filtrados em filtros de seringa com membranas de nylon, com diâmetro do filtro de 0,22 µm. Foi injetado no equipamento de cromatógrafo líquido de marca Agilente modelo Infinity 1260, acoplado a um equipamento de espectrômetro de massas de alta resolução tipo Q-TOF, também da marca Agilent no modelo 6520B, a coluna que foi utilizada da marca Agilente no modelo Zorbax C18 (dimensões 100,0 x 3,0 mm; 2,7µm).

Para a análise do extrato e seus compostos foi aplicado um gradiente durante a corrida, tendo duas fases móveis em um único sistema, sendo a fase A água acidificada com ácido fórmico (0,1 % v/v), e a fase B metanol, na Tabela 2 a seguir tem se o gradiente utilizado na eluição do EHL, e o volume injetado foi de 0,4 mL/min. Na espectrometria de massas foram usados diferentes impactos de energias no modo negativo, correspondente à 5, 10, 15, 20, 25 e 30 eV. O experimento foi realizado pelo Dr. Mário Machado Martins do IBTec-UFU.

Tabela 2. Gradiente da fase móvel utilizada no CLAE-QTOF-EM/EM.

Tempo (min.)	Fase A% (água acidificada 0,1% v/v)	Fase B% (metanol)
0	90	10
0 - 15	2	98
15- 17	0	100

Fonte. A autora.

5.5 Separação de alfa-ácidos a partir do extrato e lúpulo

Primeiramente, partiu de 5 g de EHL, que foi solubilizado em 100 mL de metanol, após a solubilização o material foi devidamente embalado e guardado na geladeira por 24 horas, com isso a solução foi filtrada para a remoção da cera graxa precipitada na solução. Em seguida, com um auxílio de uma pipeta de pasteur foi adicionada aos poucos 100 mL da solução de acetato de chumbo, até o fim da precipitação da solução de metanol com o extrato de lúpulo (Burton; Stevens, 1965).

Continuamente, realizou-se a filtração da solução com o precipitado formado, em que o filtrado foi reservado para secar em temperatura ambiente e o precipitado, no qual se encontra os alfa-ácidos, foi lavado 3 vezes com metanol. Na sequência, a esse precipitado foi adicionado 100 mL de uma solução de metanol acidificado com ácido sulfúrico (0,10% v/v). Uma nova filtração foi realizada e os alfa-ácidos ficaram no filtrado, o qual foi sequencialmente adicionado em 200 mL de água destilada.

A nova solução que tem a presença dos alfa-ácidos foi submetida há uma extração líquido-líquido utilizando 50 mL de hexano (etapa realizada por três vezes). A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica reunida foi sujeita a evaporação rotatória para a retirada do solvente hexânico presente na solução, obtendo assim uma fração purificada de alfa-ácidos.

Figura 12. Procedimento de separação de alfa-ácidos de extrato de lúpulo.



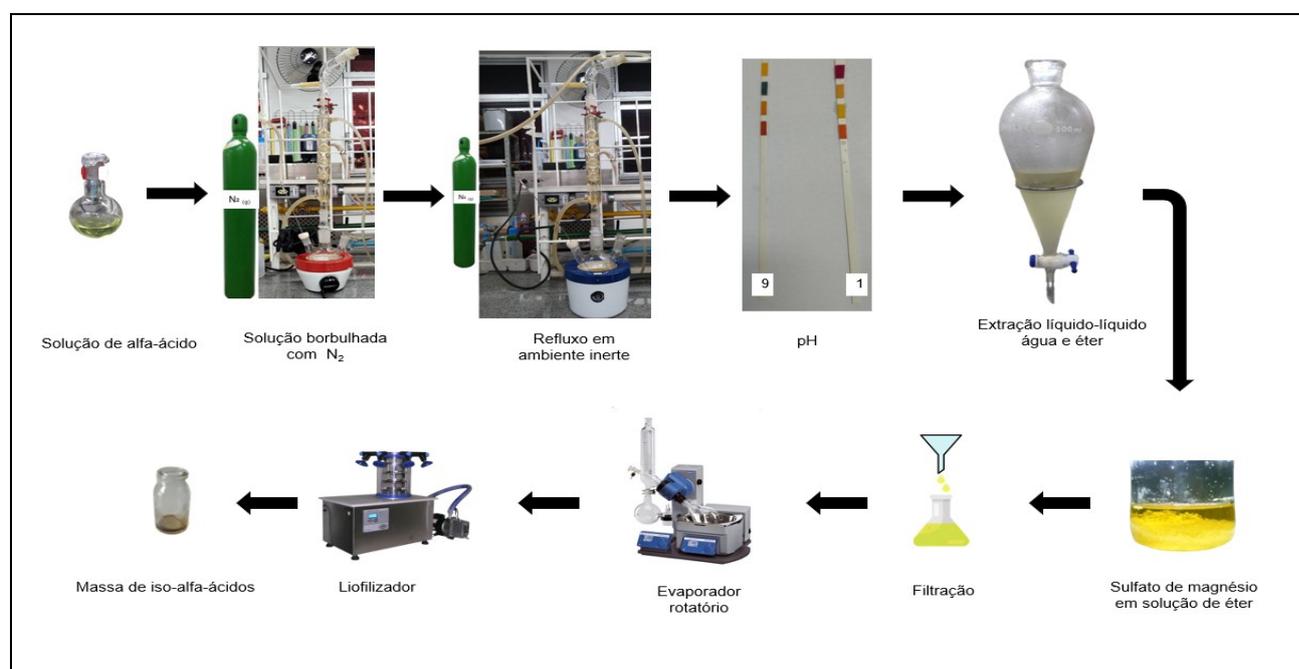
Fonte. A autora.

5.6 Isomerização dos alfa-ácidos

A isomerização foi realizada com 228 mg de alfa-ácidos, o qual foi solubilizado em 0,50 mL de etanol seguido da adição de 100 mL de carbonato de sódio, no qual a solução foi borbulhada nitrogênio gasoso por 20 minutos, com a finalidade de se criar um ambiente inerte durante todo o procedimento. Após esse período, a solução foi submetida em refluxo por 4 horas em sistema inerte. A mistura foi cuidadosamente acidificada com ácido clorídrico concentrado até o pH 1, sob banho de gelo (More, 1991).

Na sequência, realizou-se uma partição líquido-líquido com 100 mL de éter etílico (etapa realizada por três vezes). A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica com éter foi re-submetida a mais uma partição líquido-líquido utilizando 50 mL de água destilada (etapa realizada por três vezes). Em seguida, foi adicionado sulfato de magnésio anidro na fase orgânica contendo os iso-alfa-ácidos, deixando em repouso por 20 minutos, e após foi filtrada e em seguida colocada no evaporador rotatório para a retirada do solvente, pôr fim a amostra foi congelada, por uma noite e depois liofilizada, e com isso a amostra foi devidamente embalada por papel alumínio e guardada no congelador.

Figura 13. Procedimento de isomerização dos alfa-ácidos.



Fonte. A autora.

5.7 Análise da composição por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As técnicas utilizadas foram de RMN ^{13}C , o equipamento da marca BRUKER no modelo Ascend 400, sendo o método a quantidade de pulsos e o tempo utilizado em cada amostra. Com isso preparou a solução das amostras após os experimentos de separação de alfa-ácidos (100 mg) e a isomerização dos alfa-ácidos (50 mg) uma quantidade de amostra que foi dissolvida em aproximadamente 0,6 mL de clorofórmio deuterado aplicando um campo de 100 MHz. O experimento foi realizado pelo Dr. Flaysner Magayver Portela (RELAM-UFU) no método descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Método de análise da composição por RMN.

^{13}C	
Tempo	Quantidade de pulsos
1 h. 50 min. 50 seg.	8. 192

Fonte. A autora.

6 Resultados e discussão

6.1 Extração de metabólitos do lúpulo

De acordo com Choi e Verpoorte (2014), a seleção para a extração de compostos orgânicos é fundamental para os seus estudos, visto que há uma vasta diferença de metabólitos químicos presentes no substrato vegetal. Contudo, vale ressaltar outros fatores que implicam no rendimento obtido, como a polaridade do solvente escolhido que influencia na solubilidade da amostra a ser estudada, para se ter um resultado positivo em relação ao material de partida (Choi; Verpoorte, 2014).

Dessa maneira, optou-se por fazer uma busca nas literaturas sobre qual método é mais eficiente para conseguir o extrato de lúpulo, buscando um método simples que tenha ótimo rendimento. Na Tabela 4 se encontra um resumo dos principais procedimentos levantados na pesquisa bibliográfica.

Tabela 4. Levantamento bibliográfico de metodologias de extração de alfa-ácidos de lúpulo.

Solventes	Método	Resultados	Referência
a) MeOH e H ₂ O (80:20 v/v)	30 mL da solução extrativa 301,9 mg de <i>pellets</i> de lúpulo Sob agitação por 3 h Filtração	Extração favorável para estudo aplicado na área de eletroforese com a separação precisa dos picos de α e β - ácidos.	(Duarte; Adriano; de Oliveira, 2018)
b) Hexano 100%	175 ml de solvente 17 g de <i>pellets</i> de lúpulo Sob refluxo por 2 Filtrado em pressão reduzida Evaporado em evaporador rotativo	Alto rendimento na obtenção do extrato bruto, com uma cinética de reação favorecida pelo solvente.	(Rapinel <i>et al.</i> , 2020)

Fonte: A autora.

Com a análise das literaturas escolhida, decidiu realizar a extração b, considerando o hexano o melhor solvente devido a sua interação com moléculas lipofílicas. Foi necessário realizar algumas modificações na metodologia, como a mundaça na filtração que não foi realizada a pressão reduzida e sim sob a influência da gravidade. Com base na obtenção do lúpulo em *pellets* sendo mais ricos em alfa ácidos e pela quantidade do material vegetal de partida que iniciou o procedimento,

com o objetivo de manter a máxima das propriedades dos compostos que estão presentes no lúpulo em *pellets* (Rapinel *et al.*, 2020).

A Tabela 5 mostra o rendimento da extração por refluxo de *pellets* de lúpulo. A metodologia selecionada para a extração foi muito promissora, de modo que o experimento foi de fácil preparo e de simples reprodução.

Tabela 5. Rendimento da extração.

	Material vegetal umido (g)	Teor de umidade (%)	Material Vegtal seco (g)	Extrato hexânico (g)	Rendimento (%)
Lúpulo em <i>pellets</i>	47,00	9,35 ± 0,05	42,61	10,08	23,47

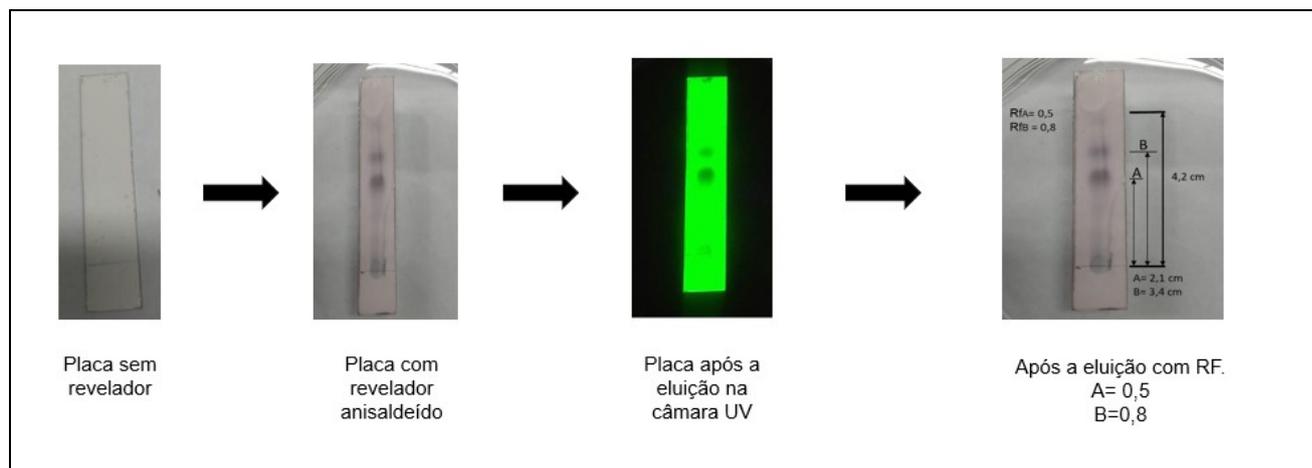
Fonte. A autora.

6.2 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A utilização da cromatografia na área da química orgânica, é um dos métodos de análises mais utilizada, visto que a sua simplicidade, eficiência e baixa utilização de amostras tornam o método analítico mais acessível para essa área. A sua utilização é vasta com a determinação de várias fases móveis com o uso de solventes orgânicos e a combinação que pode ser realizada entre eles, há também inúmeras fases estacionárias presentes no mercado que se diferem entre si, com objetivos diversos, visando na análise da presença de compostos orgânicos simultâneos ou separados para comparação de analito em amostras (Johnsson *et al.*, 2007).

A cromatografia em camada delgada muitas das vezes é associada a reveladores que conseguem revelar por meio e reagentes de coloração a classes de metabólitos secundários presente nos analitos. O revelador utilizado foi o anisaldeído que consegue revelar uma gama classe de polifenóis, terpenos, açúcares e compostos aromático que possuem coloração específica, que contribui para a análise da presença dos compostos de interesses sendo eles os alfa e betas-ácidos, são classificados como terpenos, dessa forma segue os resultados obtidos da cromatografia em camada delgada (Grande *et al.*, 2018; Wagner; Bladt, 1996).

Figura 14. Ilustração da análise do extrato de lúpulo em CCD.



Fonte: a autora.

Com a eluição da placa de CCD e o cálculo do fator de retenção conclui que, a mancha denominada como B pode se tratar do beta-ácido devida a sua baixa polaridade que tem menor interação com a placa de camada delgada que é composta por sílica (SiO_2), que tem uma polaridade mais elevada. A mancha denominada como A pode se tratar dos alfa-ácidos que estão presentes no extrato, os quais apresentam maior polaridade se comparado com os betas-ácidos, com isso a amostra A fica mais retida a superfície da placa em camada delgada, de acordo com o fator de retenção (RF).

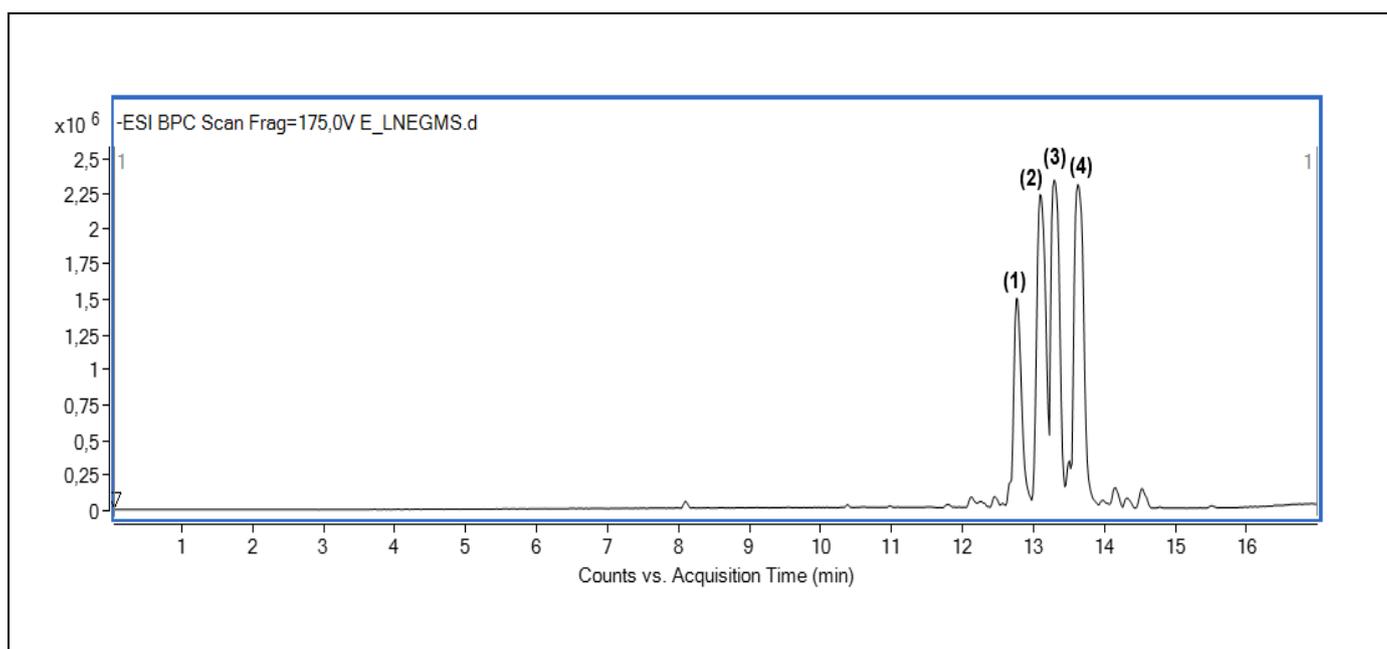
6.3 Análise da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM).

Os espectros de alta resolução adquiriu-se no modo negativo, juntamente com os espectros de massas dos fragmentos (CLAE-EM/EM) em diferentes energias de colisão. Aplicando as razões massa/carga (m/z) dos espectros e suas respectivas fragmentações, foi possível observar os alfa-ácidos no extrato hexano de lúpulo.

Os valores de m/z em alta resolução e as fragmentações foram comparados com a literatura. Dessa maneira, considerou os pares equivalentes e o erro de ppm do m/z em alta resolução, como mostra a Equação 4, com uma margem de erro aceitável entre 0 e ± 5 ppm. Ao calcular o erro, a massa teórica utilizada foi fundamentada nos dados obtidos pelo software ChemDraw®. Assim na Tabela 6 e na Figura 12 tem os cromatogramas, que se torna possível analisar os compostos que está presente no EHL.

$$E_{ppm} = \frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \times 10^6 \quad \text{Equação 4}$$

Figura 15. Cromatograma do extrato hexano de lúpulo e identificação dos compostos presentes.



Fonte. A autora.

Tabela 6. Compostos identificado no extrato hexano de lúpulo.

t_R (min)	$[M - H]^-$ Experimental	$[M - H]^-$ Massa exata	Erro (ppm)	Fragmentos (m/z) EM/EM	Fórmula molecular	Anotação dos compostos	Referências
12,72	347,1867	347,1864	0,86	20 eV: 329, 278 , 235	$C_{20}H_{28}O_5$	(1) Cohumulona	(Li <i>et al.</i> , 2023; Magalhães <i>et al.</i> , 2010)
13,02	361,2023	361,2020	0,83	25 eV: 343, 292 , 249, 237, 221	$C_{21}H_{30}O_5$	(2) Adhumulona ou Humulona	
13,39	399,2542	399,2541	0,25	25 eV: 355, 330, 287 , 219, 194	$C_{25}H_{36}O_4$	(3) Colupulona	
13,74	413,2698	413,2697	0,24	25 eV: 369, 344, 301 , 289, 276	$C_{26}H_{38}O_4$	(4) Lupulona ou Adlupulona	

Fonte. A autora.

6.4 Separação de alfa-ácidos a partir do extrato hexano de lúpulo

O alfa-ácido é a substância química no lúpulo que confere o sabor amargo na cerveja, como mencionado no tópico 2.2.1.2, sendo essa sua principal função, apesar que ele também proporciona outras propriedades a bebidas como estabilizar a formação de espuma e realçar o aroma.

Em virtude as características que os alfa-ácidos traz a cerveja, esse trabalho realizou o isolamento de uma fração dessas substâncias no extrato de lúpulo para desenvolvimento de método de identificação por RMN em extrato bruto. Inicialmente foi realizado um levantamento das metodologias existentes na literatura para o isolamento da separação de alfa-ácidos de extrato de lúpulo.

Tabela 7. Levantamento bibliográfico de metodologias de separação dos alfa-ácidos de extrato de lúpulo.

Condição	Método	Referência
----------	--------	------------

a) Precipitação ácido-álcali	Extrato de lúpulo dissolvido em solução etanol e água destilada Ajuste de pH (10-12) Repouso por 1 h, seguido de filtração Filtrado acidificado com CO ₂ Mistura em duas fases em que obteve os betas-ácidos por filtração Solução acidificada (pH: 1-2) A solução de repouso na geladeira por uma noite e obteve os alfa ácidos pela filtração da solução.	(Xu; Chen; Liu, 2021)
------------------------------	--	-----------------------

b) Precipitação de acetato de chumbo	Extrato de lúpulo dissolvido em metanol, congelado por 24 h e filtrou a solução Adicionou solução de acetato de chumbo até o fim da precipitação na solução, seguido de filtração O precipitado foi lava e com metanol e em seguida dissolvido em uma solução de metanol acidificada, seguido de filtração Adicionou água destilada ao filtrado e realizou a a extração líquido-líquido com hexano, obteve os alfa-ácidos na fase orgânica.	(Burton; Stevens, 1965)
--------------------------------------	--	-------------------------

Fonte. A autora.

Desse modo, optou-se pela escolha do método b sendo simples, eficaz e dentro do limite de realização do experimento, para desempenhar a separação do composto de interesse, no qual partiu de 5,0 g de extrato hexânico de lúpulo e obteve um rendimento de 12,53% com uma massa final de 626 mg dos alfa-ácidos isolados.

6.5 Análise de RMN de ^{13}C dos compostos presentes no extrato de lúpulo.

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é considerada uma técnica espectroscópica, que também é empregada em muitas áreas de cunho científico para determinação de estruturas tridimensionais de estruturas, reconhecimento molecular, elucidação de alguns compostos e outros fins. A análise realizada pelo RMN é bastante utilizada na química orgânica, como na sub-área de produtos naturais, devido a capacidade de identificação de estrutura complexa e simples através de seu espectro (Nascimento, 2016).

Após a reação de separação dos alfa-ácidos no extrato do lúpulo, submeteu a amostra isolada e o extrato hexano de lúpulo ao RMN para certificar que a separação foi eficaz, sem a presença de outros compostos, que podem interferir nas análises dos alfa-ácidos. Com isso, fez-se uma busca na literatura, a fim de comprovar que ocorreu o isolamento dos compostos de interesse. Ao analisar o espectro do extrato e do alfa-ácidos podemos observar que ocorreu a separação, se comparado o deslocamento químico com a literatura.

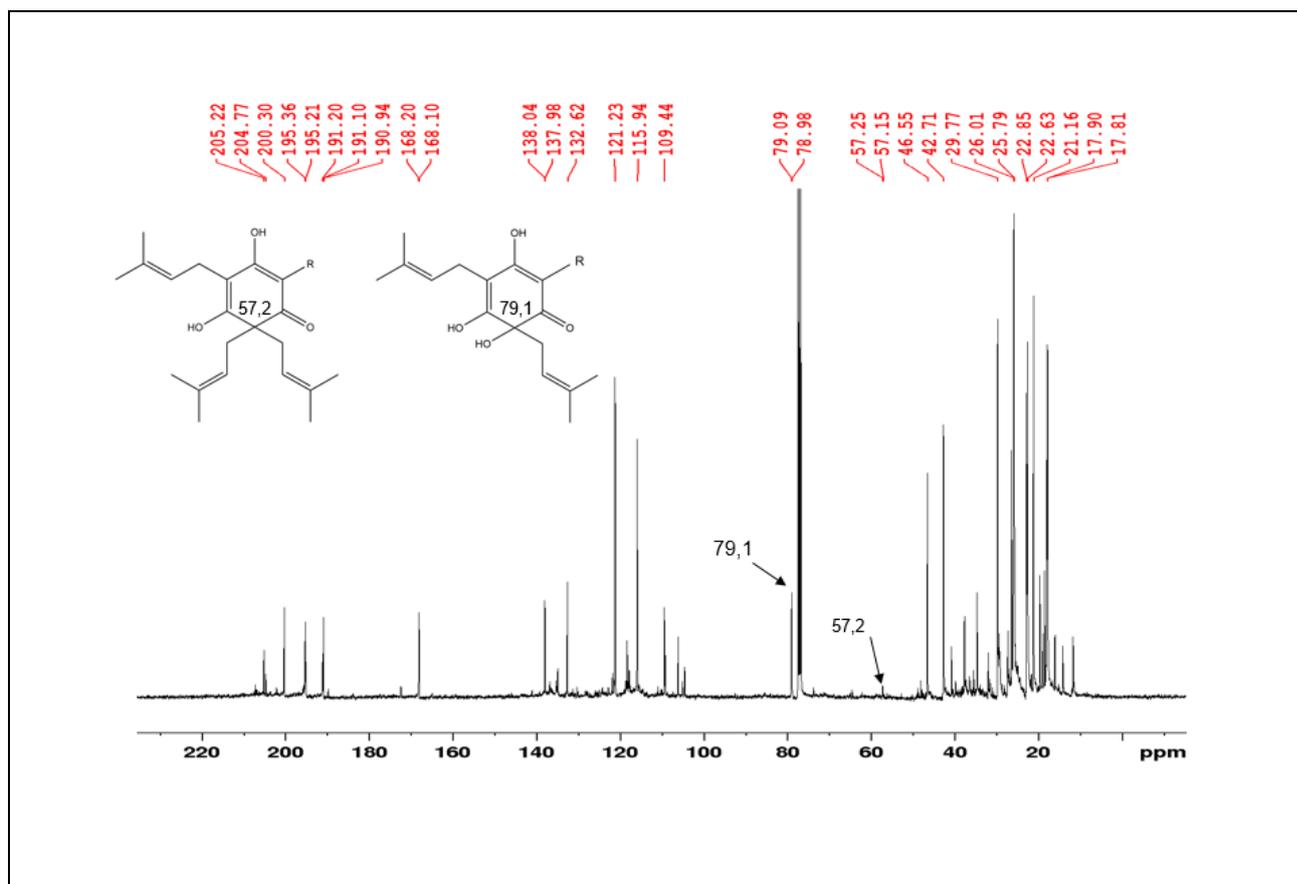
Tabela 8. Dados de RMN ^{13}C do alfa-ácido e beta-ácido comparados com a literatura.

Amostra	α -ácido (ppm)	β -ácido (ppm)	Condição
α -ácido	79,1	-	100 MHz CDCl_3
β -ácido	-	57,2	100 MHz CDCl_3
Referência	79,5 (Farg et al., 2014)	57,6 (Haseleu; Intelmann; Hofmann, 2009)	150 MHz CD_3OD

Fonte. A autora.

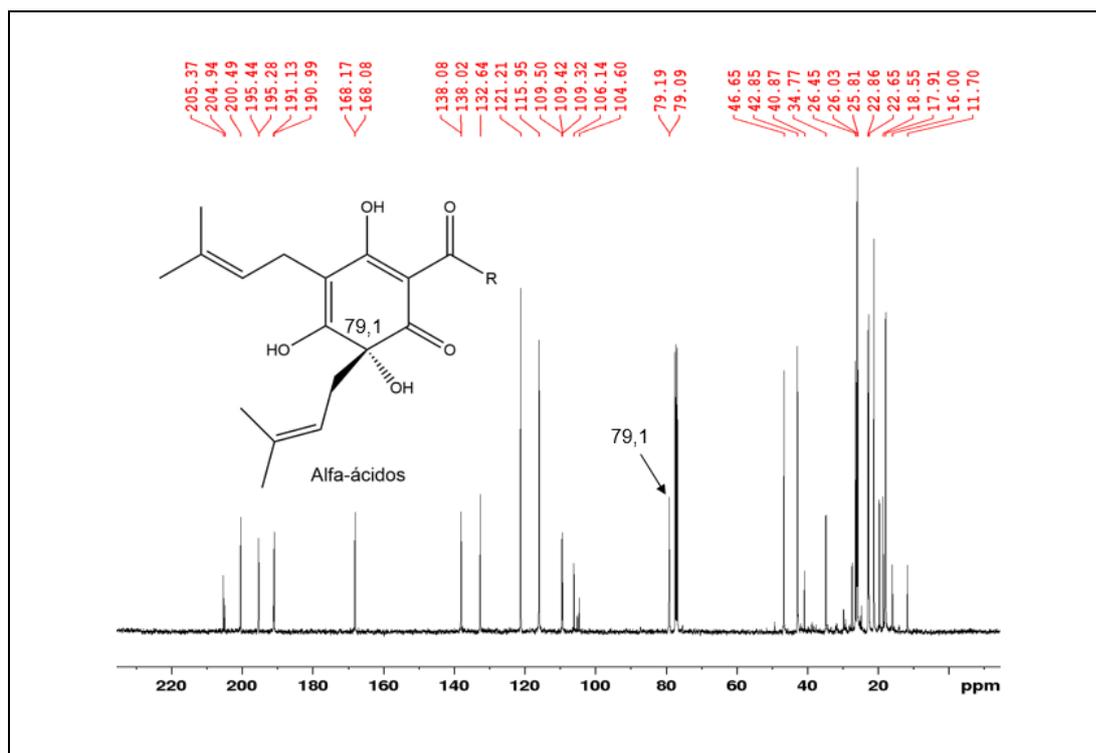
O espectro de RMN ^{13}C do extrato hexano do lúpulo no qual podemos observar a presença dos picos característicos referentes ao alfa e ao beta-ácido.

Figura 16. Espectro RMN ^{13}C do extrato hexano de lúpulo.



Fonte. A autora.

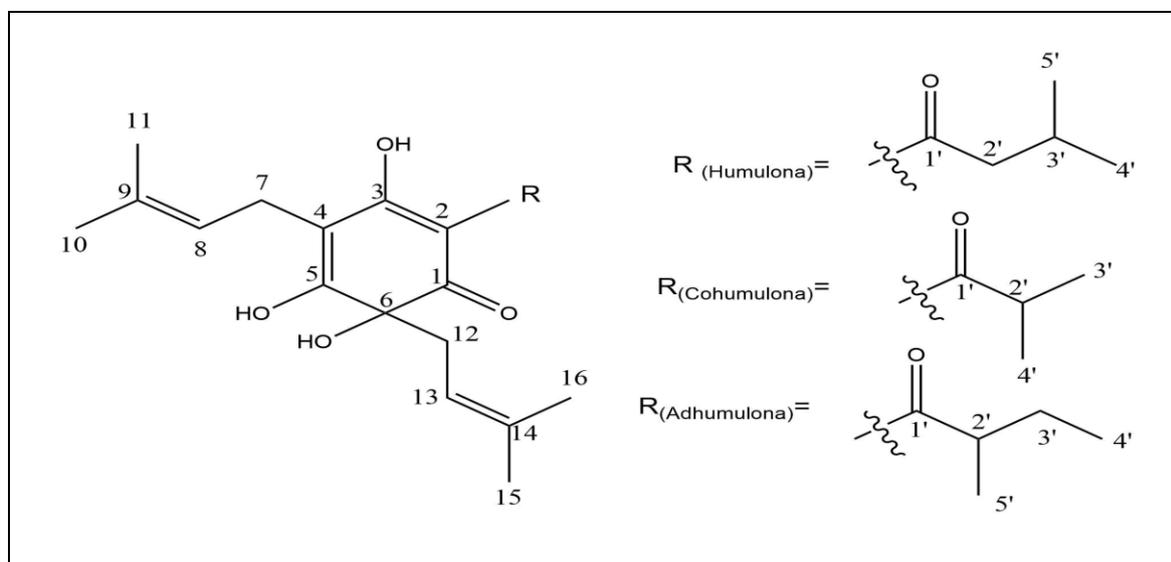
O espectro de RMN ^{13}C da fração dos alfa-ácidos separados do extrato hexano de lúpulo no qual podemos verificar a ausência do pico referente ao beta-ácidos.

Figura 17. Espectro RMN ^{13}C da fração de alfa-ácidos.

Fonte. A autora.

Assim com a fração de alfa-ácido isolado, é possível verificar se tem a presença dos análogos de alfa-ácidos presentes na amostra. Que em comparação com a literatura e seus respectivos deslocamentos químicos no espectro de RMN ^{13}C .

Figura 18. Análogos de alfa-ácidos enumerados.



Fonte. A autora.

Tabela 9. Dados de RMN ^{13}C do alfa-ácido comparados com a literatura.

Análogos	Carbono	Deslocamento ^{13}C (ppm)	
		Deslocamento ^{13}C (ppm)	Referência (Hoek; Hermans-Lokkerbol; Verpoorte, 2001)
Humulona	1'	200,49	200,77
	2'	46,66	46,79
	3'	26,03	26,19
	4'	22,65	22,87
	5'	22,45	22,65
Adhumulona	1'	204,90	204,90
	2'	40,88	40,80
	3'	26,45	27,20
	4'	11,71	11,51
	5'	16,01	15,82
Cohumulona	1'	205,38	205,34
	2'	34,77	34,95
	3'	18,55	18,97

4'	17,92	18,00
----	-------	-------

Fonte. A autora.

6.6 Isomerização dos alfa-ácidos

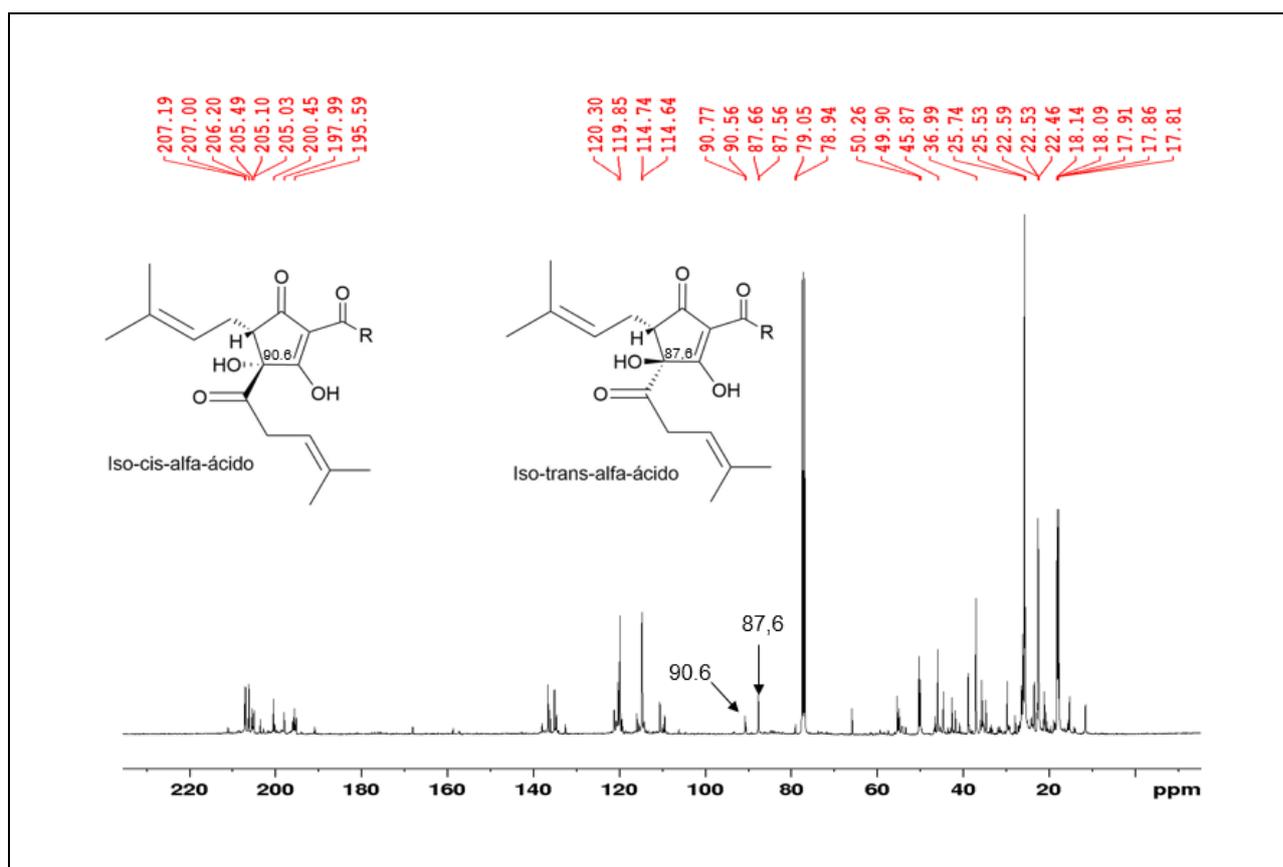
Durante o processo e fabricação da cerveja, os alfa-ácidos presentes no lúpulo são isomerizados, através do aquecimento do mosto, assim com de objetivo desenvolver um método de análise desses compostos por Ressonância Magnética Nuclear, realizou-se uma isomerização dos compostos de interesse previamente separação de outros composto que podem interferir na análise feita por espectrometria, utilizando RMN.

A isomerização dos alfa-ácidos ocorre no processo de aquecimento do mosto com a presença do lúpulo, a transformação dos alfa-ácidos em iso-alfa-ácidos é bastante favorável nesse processo, devido a temperatura elevada e interação dos isômeros de alfa-ácidos com a solução de mosto. O que confere o sabor amargo mais apurado nas bebidas são os iso-alfa-ácidos e eles contribuem significativamente no IBU, como visto anteriormente, que quando calculado a unidade de amargor da bebida, está relacionado com os isômeros de alfa-ácidos presentes na solução.

Deste modo, a isomerização dos alfa-ácidos se torna importante para a análise de amargor e o experimento proposto tem o intuito de alcançar isomerização, visando na eficácia e praticidade de sua realização, para fins de perspectivas futuras de sua aplicação em amostras com misturas complexas contendo o lúpulo (More, 1991).

No experimento, utilizou uma massa inicial de 228 mg da fração de alfa-ácidos isolada. Ao final do processo, obtive uma massa final de 143 mg de iso-alfa-ácidos. Os resultados do experimento foi satisfatórios, demonstrando um rendimento final de 62,52% de iso-alfa-ácidos.

Após o procedimento de isomerização, a amostra foi submetida ao RMN ¹³ C, a fim de confirmar que a reação ocorreu para uma análise do método elaborado. Assim o espectro mostra que obteve a isomerização, mas ela não foi totalmente completa ainda sobrando alguns resquícios da presença de alfa-ácidos.

Figura 19. Espectro RMN ^{13}C da amostra de iso-alfa-ácidos.

Fonte. A autora.

Tabela 10. Dados de ^{13}C na amostra isomerizada.

	^{13}C iso- <i>cis</i> - α -ácido (ppm)	^{13}C iso- <i>trans</i> - β -ácido (ppm)	Condição
Amostra	90,5	87,6	100 MHz CDCl_3
Referência	90,6	87,6	CDCl_3 MHz 600

Fonte. A autora.

7. CONCLUSÃO

Os métodos utilizados demonstraram eficácia dentro dos parâmetros do laboratório ao realizar a extração a partir dos *pellets* de lúpulo, seguido pelo isolamento dos alfa-ácidos e sua isomerização. Os resultados obtidos foram satisfatórios para serem aplicados em uma metodologia de identificação por RMN ^{13}C , pois foram estabelecidos os picos característicos que possibilitam esse controle. Na próxima etapa, planejamos desenvolver um procedimento de quantificação dos alfa-ácidos em fitoterápicos e dos iso-alfa-ácidos em cervejas artesanais, ampliando assim o alcance e a aplicabilidade dessas técnicas.

Essa pesquisa destaca não apenas a eficiência dos métodos empregados, mas também sua relevância prática tanto no campo da produção de fitoterápicos quanto na indústria de bebidas. A capacidade de identificar e quantificar componentes específicos como os alfa-ácidos e os iso-alfa-ácidos é crucial para garantir a qualidade e padronização desses produtos, contribuindo para a segurança e a consistência dos resultados em processos industriais e de controle de qualidade.

8. REFERÊNCIAS

- Abiko, Y.; Paudel, D.; Uehara, O. Hops components and oral health. **Journal of Functional Foods**, [s. l.], v. 92, n. March, p. 105035, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105035>.
- Almaguer, C. *et al.* Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 120, n. 4, p. 289–314, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105035>.
- Alves, V. *et al.* Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 326, n. November 2019, p. 126856, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126856>.
- Barreto, I. Pilau, F. G. Temperatura base e plastocrono de uma variedade de lúpulo. **Agrometeoros**, [s. l.], v. 31, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.31062/agrom.v31.e027116>.
- Bocque, L. *et al.* **Humulus lupulus L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology**. [S. l.: s. n.], 2018-. ISSN 1572980X.v. 17. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9584-y>.
- Bortoli, D. A. da S. Santos, F. Stocco, N. M. Orelli Jr., A. Tom, A. Neme, F. F. Nascimento, D. D. do. Leveduras e produção de cervejas-Revisão. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, [s. l.], v. 3, p. 45–58, 2013. ISSN 2236-9171.
- Briggs, D. E. *et al.* **Brewing: Science and Practice**. [S. l.: s. n.], 2004. ISBN 9781855734906. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9781855739062>.
- Burton, J. S.; Stevens, R. EVALUATION OF HOPS. XI. THE HARD RESIN AND PRESENCE OF HULUPINIC ACID. **Journal of the Institute of Brewing**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 51–56, 1965. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1965.tb02024.x>.
- Cattoor, K. *et al.* Metabolism of hop-derived bitter acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 61, n. 33, p. 7916–7924, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf300018s>.
- Cerveja, Condade da. **Tabela de IBU da Cerveja**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.condadodacerveja.com.br/tabela-de-ibu-cerveja/>. Acesso em: 2 maio 2024.
- Chiancone, B. *et al.* Vitro-derived hop (*Humulus lupulus* L.) leaves and roots as source of bioactive compounds: antioxidant activity and polyphenolic profile. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s. l.], v. 153, n. 2, p. 295–306, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02462-1>.
- Choi, Y. H.; Verpoorte, R. Metabolomics: What you see is what you extract. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 289–290, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/pca.2513>.
- Coelho, N. D. M. *et al.* Chemical concepts involved in beer production: A review. **Revista Virtual de Química**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 120–147, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200011>.

Contin, D. R. *et al.* Exploring the tropical acclimation of European and American hop cultivars (*Humulus lupulus* L.): Focus on physiology, productivity, and chemical composition. **European Journal of Agronomy**, [s. l.], v. 151, n. August, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eja.2023.126990>.

Daniel, R. Designing great beers - The ultimate guide to brewing classic beer styles. **Brewers Publication**, [s. l.], p. 612, 2000. ISBN: 10: 0937381500.

De-Souza, R. *et al.* Growth regulators and their reflection on different hop genotypes cultivated under in vitro conditions. **Brazilian Journal of Biology**, [s. l.], v. 82, p. 1–8, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.242596>.

Dezordi, A. P. R.; Vieira, E. P.; Sausen, J. O. Gestão Estratégica De Custos No Segmento De Microcervejarias Artesanais: Variáveis De Precificação Do Produto. **Gestão & Planejamento**, [s. l.], v. 23, p. 379–398, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.53706/gep.v.23.7422>.

Duarte, L. M.; Adriano, L. H. C.; De Oliveira, M. A. L. Capillary electrophoresis in association with chemometrics approach for bitterness hop (*Humulus lupulus* L.) classification. **Electrophoresis**, [s. l.], v. 39, n. 11, p. 1399–1409, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elps.201700420>.

Durello, R. S.; Silva, L. M.; Bogusz, S. Hop Chemistry. **Quimica Nova**, [s. l.], v. 42, n. 8, p. 900–919, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>.

Fagotti, R. L. V.; Ribeiro, J. C. Uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos em insônia: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 35–44, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.29327/226760.3.2-4>.

Filho, J. G. M.; Silva, M. E.; Castelo, J. S. F. The identity constitution of the craft beer consumer in the City of Fortaleza (Brazil). **Brazilian Business Review**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 381–398, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15728/bbr.2020.17.4.2>.

Flaviis, R. D. *et al.* An integrative multi-omics approach aimed to gain insight on the effect of composition, style, yeast, and wheat origin on wheat craft beer flavour. **Food Chemistry**, [s. l.], p. 138387, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138387>.

González, Z. Eduardo, *et al.* Efecto farmacológico de los diferentes compuestos activos del lúpulo sobre los primeros síntomas físicos y emocionales en la etapa previa a la menopausia. **Revista Espanola de Nutricion Comunitaria**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 37–43, 2013. ISSN: 11353074.

Grande, R. *et al.* The Use of Anisaldehyde Sulfuric Acid as an Alternative Spray Reagent in TLC Analysis Reveals Three Classes of Compounds **Preprints**, [s. l.], v. 2018020151, n. February, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.20944/preprints201802.0151.v1>.

Hinojosa-Avila, C. R. *et al.* Exploring the potential of probiotic-enriched beer: Microorganisms, fermentation strategies, sensory attributes, and health implications. **Food Research International**, [s. l.], v. 175, n. September 2023, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113717>.

Hoek, A. C.; Hermans-Lokkerbol, Ank, C.J.; Verpoorte, R. An improved NMR method

for the quantification of α -acids in hops and hop products. **Phytochemical Analysis**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 53–57, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/1099-1565\(200101/02\)12:1%3C53::AID-PCA550%3E3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1099-1565(200101/02)12:1%3C53::AID-PCA550%3E3.0.CO;2-E).

Johnsson, R. *et al.* Evaluation of quantitative thin layer chromatography using staining reagents. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1164, n. 1–2, p. 298–305, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.029>.

Karabín, M. *et al.* Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 542–567, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.029>.

Keukeleire, D. D. Química nova, 23(1) (2000) 108. **Fundamentals of Beer and Hop Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 1, p. 108–112, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>.

Klimczak, K.; Cioch-Skoneczny, M. Changes in beer bitterness level during the beer production process. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 249, n. 1, p. 13–22, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04154-0>.

Li, Y. *et al.* Identification of colupulone and lupulone as the main contributors to the antibacterial activity of hop extracts using activity-guided fractionation and metabolome analysis. **Food Research International**, [s. l.], v. 169, n. August 2022, p. 112832, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112832>.

Lúpulo, Associação Brasileira de Produtores de. **Agrolúpulo**. [S. l.], 2018. Disponível em: <https://aprolupulo.com.br/>. Acesso em: 15 jan. 2024.

Lúpulo. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.biodiversity4all.org/taxa/53779-Humulus-lupulus>. Acesso em: 10 jan. 2024.

Macleod, L.; Evans, E. Barley: Malting. **Encyclopedia of Food Grains: Second Edition**, [s. l.], v. 3–4, p. 423–433, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394437-5.00153-4>.

Magalhães, P. J. *et al.* Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [s. l.], v. 1217, n. 19, p. 3258–3268, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.10.068>.

Mendes, F. M. *et al.* A cultura do lúpulo: botânica e variedades. **Revista Agronomia Brasileira**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 4–6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.29372/rab201712>.

Mikyška, A. *et al.* Static or dynamic dry-hopping of beer: a comparison of analytical and sensory beer profiles. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 250, n. 1, p. 213–224, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04379-7>.

Ministério da agricultura e pecuária. **Anuário da cerveja**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/setor-cervejeiro-segue-crescendo-a-cada-ano-aponta-anuario>. Acesso em: 10 jan. 2023.

More, N. The isohumulones. **Developments in Food Science**, [s. l.], v. 27, n. C, p. 88–126, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-88165-6.50009-3>.

Muxel, A. A. **Química da cerveja :uma abordagem química e bioquímica das matérias-primas, processo de produção e da composição dos compostos de sabores da cerveja**. 1 ed.ed. Curitiba: [s. n.], 2022. ISBN: 978-65-250-2105-8.

Muzzolon, E. *et al.* Processamento Da Cevada Para Produção De Malte: Parâmetros De Qualidade. **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Volume 3**, [s. l.], p. 204–225, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.37885/210203295>.

NASCIMENTO, Cláudia. **Ressonância magnética nuclear**. 1 eded. [S. l.: s. n.], 2016. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788521210191/pageid/11>. ISBN: 978-8521210184.

Paguet, A. S. *et al.* Phytochemical characterisation and aromatic potential for brewing of wild hops (*Humulus lupulus* L.) from Northern France: Towards a lead for local hop varieties. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 433, n. August 2023, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.137302>.

Paternoster, A. *et al.* The performance of beer packaging: Vibration damping and thermal insulation. **Food Packaging and Shelf Life**, [s. l.], v. 11, n. 2017, p. 91–97, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.01.004>.

Rapinel, V. *et al.* 2-methyloxolane as a bio-based solvent for green extraction of aromas from hops (*humulus lupulus* l.). **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 7, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25071727>.

Rosa, N. A.; Afonso, J. C. A Química da Cerveja. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**, [s. l.], v. 37, p. 8, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.52590/M3.P589.A3000790>.

Sawicka, B. *et al.* Assessment of the suitability of aromatic and high-bitter hop varieties (*Humulus lupulus* l.) for beer production in the conditions of the małopolska vistula gorge region. **Fermentation**, [s. l.], v. 7, n. 3, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/fermentation7030104>.

Schönberger, C. When bitter is better. **Monatsschrift fur Brauwissenschaft**, [s. l.], p. 56–66, 2006. ISSN: 20550278.

Souza, P. G.; Carvalho, M. F. Avaliação do oxigênio dissolvido na cerveja durante o processo de trasfega entre a fermentação e maturação. **Brazilian Journal of Science**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 75–81, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.14295/bjs.v1i2.23>.

Spósito, M. B. *et al.* A cultura do lúpulo. **Série Produtor Rural**, [s. l.], v. 68, p. 81, 2019. Disponível em: www.esalq.usp.br/biblioteca. ISSN: 1414-4530.

Štěrba, J.; Punčochář, M.; Brányik, T. The effect of hydrodynamic cavitation on isomerization of hop alpha-acids, wort quality and energy consumption during wort boiling. **Food and Bioproducts Processing**, [s. l.], v. 144, n. February, p. 214–219, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2024.02.001>.

Travis, D. *et al.* HPLC Analysis of alpha- and beta-Acids in Hops. **Jornal of Chemical Education**, [s. l.], v. 85, p. 954–956, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ed085p954>.

Wagner, H.; Bladt, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2nd

eded. Berlim: [s. n.], 1996. ISBN: 3-540-58676-2. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-00574-9>.

Xu, D.; Chen, T.; Liu, Y. The physical properties, antioxidant and antimicrobial activity of chitosan–gelatin edible films incorporated with the extract from hop plant. **Polymer Bulletin**, [s. l.], v. 78, n. 7, p. 3607–3624, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00289-020-03294-1>.

Young, J.; Oakley, W. R.M.; Fox, G. Humulus lupulus and microbes: Exploring biotic causes for hop creep. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 114, n. March, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2023.104298>.