

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

KARINNE TEIXEIRA GONÇALVES

ESTUDO QUÍMICO DE LÚPULOS CULTIVADOS EM DIFERENTES LOCALIDADES
POR RMN E CLAE - EM/EM E DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO
ELETROANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ISO- α -ÁCIDOS EM CERVEJAS

Uberlândia

2026

KARINNE TEIXEIRA GONÇALVES

ESTUDO QUÍMICO DE LÚPULOS CULTIVADOS EM DIFERENTES LOCALIDADES
POR RMN E CLAE - EM/EM E DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO
ELETROANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ISO- α -ÁCIDOS EM CERVEJAS

Trabalho de Dissertação apresentado ao
Instituto de Química da Universidade Federal
de Uberlândia como requisito parcial para
obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Raquel Maria Ferreira de Sousa

Uberlândia

2026

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

G635 2026	Gonçalves, Karinne Teixeira, 1999- ESTUDO QUÍMICO DE LÚPULOS CULTIVADOS EM DIFERENTES LOCALIDADES POR RMN E CLAE - EM/EM E DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ELETROANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ISO- ÁCIDOS EM CERVEJAS [recurso eletrônico] / Karinne Teixeira Gonçalves. - 2026. Orientadora: Raquel Maria Ferreira de Sousa. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Química. Modo de acesso: Internet. DOI http://doi.org/10.14393/ufu.di.2026.579 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações. 1. Química. I. Sousa, Raquel Maria Ferreira de, 1981-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Química. III. Título. CDU: 54
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

KARINNE TEIXEIRA GONÇALVES

ESTUDO QUÍMICO DE LÚPULOS CULTIVADOS EM DIFERENTES LOCALIDADES
POR RMN E CLAE - EM/EM E DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO
ELETROANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ISO- α -ÁCIDOS EM CERVEJAS

Trabalho de Dissertação apresentado ao
Instituto de Química da Universidade Federal
de Uberlândia como requisito parcial para
obtenção do título de mestre em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Uberlândia, 17/07/2026

Banca Examinadora:

Bruna Cláudia Lourenção – Doutora (UEMG)

Marcos Pivatto – Doutor (UFU)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química
 Av. João Naves de Ávila, 2121, Bloco 5I - Bairro Santa Mônica, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3239-4385 - www.cpgquimica.iq.ufu.br - cpgquimica@ufu.br



ATA

Programa de Pós-Graduação em:	Química				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico, 425, PPGQUI				
Data:	Dezessete de julho de dois mil e vinte e seis	Hora de início:	14h	Hora de encerramento:	17:55
Matrícula do Discente:	12422QMI004				
Nome do Discente:	Karinne Teixeira Gonçalves				
Título do Trabalho:	“Estudo químico de lúpulos cultivados em diferentes localidades por RMN e CLAE-EM/EM e desenvolvimento de um método eletroanalítico para quantificação de iso- α -ácidos em cervejas”				
Área de concentração:	Química				
Linha de pesquisa:	Química Medicinal, Química de Produtos Naturais e Síntese Orgânica				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	“Desenvolvimento de métodos de análises de metabólitos secundários de produtos naturais”				
ODS 8 - 9	ODS 8 -Trabalho decente e crescimento econômico: promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos. ODS 9 -Indústria, inovação e infraestrutura: construir infraestrutura resiliente, promover a industrialização inclusiva e sustentável, e fomentar a inovação.				

Reuniu-se, por webconferência, *link*: <https://meet.google.com/obb-ahbk-nqy>, e, no auditório da Pós-graduação em Química, bloco 5I, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Química, assim composta pelos professores doutores: **Marcos Pivatto**, da Universidade Federal de Uberlândia; **Bruna Cláudia Lourenção**, da Universidade do Estado de Minas Gerais/UEMG; e **Raquel Maria Ferreira de Sousa**, orientador(a) do(a) candidato(a).

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

A seguir o 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):

Aprovado.

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O discente compromete-se a acatar as sugestões de correção da banca examinadora e depositar a versão final da dissertação no repositório da UFU em até 30 (trinta) dias.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Maria Ferreira de Sousa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/07/2026, às 17:55, 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 Pivatto, Professor(a) do Magistério Superior**, em 17/07/2026, às 17:56, 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 **Bruna Cláudia Lourenção, Usuário Externo**, em 17/07/2026, às 17:57, 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 **7363028** e o código CRC **6115B237**.

‘Algumas teorias precisam ser testadas.

-Ali Hazelwood’

AGRADECIMENTOS

A minha família, e aos meus cachorros 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 e apoio, ao longo do projeto.

Ao laboratório Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPpEN) e as pessoas que fazem parte dele, pelo acolhimento, carinho e suporte ao longo da realização do projeto, pelas contribuições na realização deste trabalho.

Ao laboratório Núcleo de Pesquisas em Eletroquímica (NuPE) pela parceria e amizades que fiz, que foi a minha base na eletroquímica, por todos os integrantes no grupo sou grata.

Aos meus amigos que fiz ao longo da jornada, que me ajudou de mil formas possíveis, e que contribui para a minha melhor versão.

Aos escritores de livros que foram meu porto seguro, durante toda essa aventura e que tornou os dias mais suportáveis.

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.

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

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

RESUMO

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma das principais matérias-primas utilizadas na produção de cerveja, sendo responsável por características sensoriais importantes, como aroma e, principalmente, amargor. Durante a fervura do mosto, os α -ácidos presentes no lúpulo sofrem isomerização térmica, originando os iso- α -ácidos, compostos diretamente relacionados à intensidade do amargor da bebida. Neste trabalho, variedades de lúpulos comerciais foram caracterizadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e CLAE-EM/EM acoplada à Espectrometria de Massas. As análises por RMN permitiram a obtenção de informações estruturais, através dos *fingerprints* que viabilizaram a determinação dos principais metabólitos presentes nos extratos de lúpulo, enquanto as análises por CLAE-IES-EM/EM permitiu a anotação dos principais metabólitos presentes nas amostras. Dessa forma, para a variedade Sabro de lúpulo, foi realizada a separação da mistura de α -ácidos, com rendimento de 31 % do extrato de lúpulo, seguida de sua isomerização, obtendo 42,5%, da mistura de iso- α -ácidos. A confirmação dessas estruturas foi realizada por espectroscopia de RMN de ^{13}C . Os α -ácidos apresentaram sinal característicos de δ 79,2 ppm, enquanto os isômeros *cis* e *trans* dos iso- α -ácidos apresentaram sinais na faixa de δ 205,1 e 207,3 ppm. Posteriormente, foi conduzido um estudo eletroquímico utilizando uma folha de grafite como eletrodo de trabalho para investigar o comportamento dos iso- α -ácidos e sua relação com o amargor da cerveja. Os perfis voltamétricos obtidos para α -ácidos e iso- α -ácidos apresentaram regiões de potencial diferentes, e as análises foram direcionadas aos iso- α -ácidos, principais responsáveis pelo amargor da bebida. A análise direta de cervejas comerciais revelou a presença de compostos interferentes, como o metabissulfito de sódio, tornando necessário um pré-tratamento das amostras por extração com isooctano. A eficiência desse procedimento foi acompanhada por CLAE-IES-EM/EM, confirmando a presença dos iso- α -ácidos após a etapa de extração. Por fim, os valores de amargor, expressos IBU, foram determinados por Voltametria de Onda Quadrada, obtendo valores determinados próximos de IBU (IBU_{medido}: BS1 = 48,1; BS2 = 41,6; BS3: 17,6) aos comparados pelos valores dos fabricantes (IBU_{declarado}: BS1 = 46; BS2 = 40; BS3=18). Os resultados demonstraram que o método eletroanalítico desenvolvido apresenta uma alternativa com melhor desempenho para a determinação de iso- α -ácidos e para aplicações futuras no controle de qualidade de cervejas.

Palavras-chave: folha de grafite, *Humulus lupulus*, IBU, lúpulo e RMN de ^{13}C

ABSTRACT

Hops (*Humulus lupulus*) are a key raw material in beer production, responsible for important sensory characteristics such as aroma and, notably, bitterness. During wort boiling, the α -acids present in hops undergo thermal isomerization to form iso- α -acids compounds directly linked to the beverage's bitterness intensity. In this study, commercial hop varieties were characterized using Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and High-Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry. NMR analysis provided structural information via fingerprints, enabling the identification of major metabolites in the hop extracts, while HPLC-ESI-MS/MS analysis allowed for the annotation of the primary metabolites present in the samples. Specifically, for the Sabro hop variety, the α -acid mixture was separated yielding 31% of the hop extract and subsequently isomerized, resulting in a 42.5% yield of the iso- α -acid mixture. Structural confirmation was achieved through ^{13}C NMR spectroscopy; α -acids exhibited a characteristic signal at δ 79.2 ppm, whereas the *cis* and *trans* isomers of the iso- α -acids showed signals in the δ 205.1–207.3 ppm range. Subsequently, an electrochemical study using a graphite sheet as the working electrode was conducted to investigate the behavior of iso- α -acids and their relationship to beer bitterness. The voltammetric profiles obtained for α -acids and iso- α -acids displayed distinct potential regions; consequently, the analysis focused on iso- α -acids, as they are the primary contributors to the beverage's bitterness. Direct analysis of commercial beers revealed the presence of interfering compounds, such as sodium metabisulfite, necessitating sample pre-treatment via isooctane extraction. The efficiency of this procedure was monitored using HPLC-ESI-MS/MS, confirming the presence of iso- α -acids following the extraction step. Finally, bitterness values expressed in IBU were determined using Square Wave Voltammetry; the measured values (BS1 = 48.1; BS2 = 41.6; BS3 = 17.6) were close to those declared by the manufacturers (BS1 = 46; BS2 = 40; BS3 = 18). The results demonstrated that the developed electroanalytical method offers a higher-performance alternative for determining iso- α -acids and for future applications in beer quality control.

Keywords: graphite leaf, *Humulus lupulus*, IBU, hops and ^{13}C NMR

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Isomerização de α -ácidos do lúpulo em iso- α -ácidos, no processo cervejeiro.	18
Figura 2. A) Plantação de lúpulo se desenvolvendo em cordas e em B) ampliação da planta e folha de lúpulo.	21
Figura 3. Comparação morfológica das espécies de <i>Humulus</i>	24
Figura 4. A) Cone feminino da espécie de <i>Humulus lupulus</i> e B) Glândulas lupulinas.	27
Figura 5. Compostos de óleos essenciais de <i>Humulus lupulus</i>	28
Figura 6. Comparação estrutural dos compostos encontrados nas resinas macias α -ácidos e β -ácidos.	30
Figura 7. Estruturas química dos análogos principais de α -ácidos.	31
Figura 8. Mecanismo de isomerização de α -ácidos isolados do lúpulo.	32
Figura 9. Estruturas química dos análogos principais de α -ácidos.	34
Figura 10. Etapas do processo de fabricação de cerveja.	38
Figura 11. Fluxograma do preparo de extrato de lúpulo.	41
Figura 12. Fluxograma de isolamento de α -ácidos.	43
Figura 13. Fluxograma para a isomerização dos α -ácidos isolados em iso- α -ácidos.	45
Figura 14. Fluxograma de determinação de IBU das amostras de cerveja extraída por isoctano.	47
Figura 15. Fluxograma de preparo das amostras de iso- α -ácidos e α -ácidos para aplicação nas técnicas eletroquímicas.	48
Figura 16. Representação da célula eletroquímica e seus componentes A) Parafusos B) Célula eletroquímica 3D C) Base da célula eletroquímica D) eletrodo de folha de grafite e E) Barra magnética.	49
Figura 17. Estruturas químicas de α -ácidos e iso- α -ácidos, informados pelo RMN- ^{13}C	52
Figura 18. Voltamogramas Cíclicos usando eletrodo de folha de grafite na presença de (A) iso- α -ácidos (20 mg L^{-1}) e (B) α -ácidos (20 mg L^{-1}) em solução tampão BR (pH 2,0). Parâmetros: Velocidade de varredura= 50 mV s^{-1} , Incremento de potencial = 5 mV . As linhas tracejadas correspondem ao branco.	55
Figura 19. Voltamogramas de VOQ usando eletrodo de folha de grafite na presença de (A) iso- α -ácidos (2 mg L^{-1}) e (B) α -ácidos (2 mg L^{-1}) em solução tampão BR (pH 2,0). Parâmetros: amplitude: 40 mV ; Incremento de potencial: 5 mV ; frequência: 50 s^{-1} . As linhas tracejadas correspondem aos sinais em branco.	56

Figura 20. Voltamogramas utilizando eletrodo de folha de grafite na presença de 2,0 mg L ⁻¹ de iso- α -ácidos, para solução tampão 0,04 mol L ⁻¹ BR pH 2; 0,1 mol L ⁻¹ H ₃ PO ₄ ; 0,1 mol L ⁻¹ HClO ₄ . Parâmetros: amplitude: 30 mV; Incremento de potencial: 6 mV; frequência: 10 s ⁻¹	57
Figura 21. (A) Respostas voltamétricas da influência do pH na corrente de pico e no potencial de pico, na presença de iso- α -ácidos (2 mg L ⁻¹), com escala de pH de 2,0 – 5,0. (B) Gráfico do potencial de pico (<i>E_p</i>) <i>versus</i> pH. Parâmetros: amplitude: 40 mV; Incremento de potencial: 5 mV; frequência: 10 s ⁻¹	58
Figura 22. Proposta de mecanismo de oxidação das moléculas de iso- α -ácidos.....	60
Figura 23. (A) Resposta voltamétrica do estudo da amplitude para as moléculas de iso- α -ácidos em 2,5 mg L ⁻¹ . (B) Gráfico do pico de corrente (<i>I_p</i>) <i>versus</i> modulação de amplitude <i>versus</i> largura à meia altura do pico (<i>W_{1/2}</i>). Parâmetros: Incremento de potencial: 6 mV e frequência: 20 s ⁻¹	62
Figura 24. (A) Resposta voltamétrica do estudo de incremento de potencial para as moléculas de iso- α -ácidos em 2,5 mg L ⁻¹ . (B) Gráfico do pico de corrente (<i>I_p</i>) <i>versus</i> incremento de potencial <i>versus</i> largura à meia altura do pico (<i>W_{1/2}</i>). Parâmetros: Amplitude: 30 mV; 6 mV e frequência 20 s ⁻¹	63
Figura 25. (A) Resposta voltamétrica do estudo de incremento de potencial para as moléculas de iso- α -ácidos em 2,5 mg L ⁻¹ . (B) Gráfico do pico de corrente (<i>I_p</i>) <i>versus</i> incremento de potencial <i>versus</i> largura à meia altura do pico (<i>W_{1/2}</i>). Parâmetros: Incremento de potencial: 6 mV e Amplitude: 20mV.	64
Figura 26.(A) Respostas voltamétricas da curva analítica de iso- α -ácidos em 0,1 – 4,0 mg L ⁻¹ , adicionadas sucessivamente nas condições otimizadas. (B) Calibração da curva analítica. Parâmetros: amplitude: 30 mV; incremento de potencial: 6 mV; frequência: 10 s ⁻¹	66
Figura 27. Estudo da resposta voltamétrica da diluição da cerveja (BS1), com a varredura de potencial de +0,2V até +1,4V. Diluições: 10 vezes (linha marrom); 25 vezes (linha verde); 50 vezes (linha rosa); 100 vezes (linha azul); 500 vezes (linha vermelha) e 1000 vezes (linha preta). Parâmetros: amplitude: 30 mV; incremento de potencial: 6 mV; frequência: 10 s ⁻¹	69
Figura 28. Respostas voltamétricas das alterações na corrente de pico para os iso- α -ácidos (1,5 mg L ⁻¹) em tampão BR2, após a adição de interferentes (1 μ mol L ⁻¹): (A) MET: amarelo escuro; (B) OXT: vermelho; (C) PYR: rosa. Gráfico ao lado correspondente a recuperação dos interferentes em relação aos iso- α -ácidos. Parâmetros: amplitude: 30 mV; incremento de potencial: 6 mV; frequência: 10 s ⁻¹ . As linhas pretas representam as respostas antes da adição.	71

Figura 29. Respostas voltamétricas das alterações na corrente de pico para os iso- α - ácidos ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) em tampão BR2, após a adição de diferentes interferentes ($1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Interferentes: (D) AA –ciano; (E) CAF– vinho; (F) CAR – magenta; (G) RIB – cinza; (H) NaCl – verde; (I) FRU – amarelo; (J) GLU – azul; (K) TYR – roxo. Gráfico ao lado correspondente a recuperação dos interferentes em relação aos iso- α - ácidos. Parâmetros: amplitude: 30 mV ; incremento de potencial: 6 mV ; frequência: 10 s^{-1} . As **linhas pretas** representam as respostas antes da adição.

..... 72

Figura 30. Voltamogramas de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ da amostra BS4 em branco, representada pela linha tracejada, com adição sucessiva da fração iso- α -ácidos em $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (linha-azul). Parâmetros: amplitude: 30 mV ; incremento de potencial: 6 mV ; frequência: 10 s^{-1} 76

Figura 31. Voltamogramas corrigidas pela linha de base para extratos de cerveja BS1 ($70\times$), BS2 ($350\times$) e BS3 ($70\times$). Linha tracejada em preto sendo o branco. BS1 (**A**): inicialmente sem iso- α -ácidos linha azul-claro, e após adições sucessivas de $0,20 \text{ mg L}^{-1}$ de iso- α -ácidos linhas em azuis-escuros. BS2 (**B**): inicialmente sem iso- α -ácidos linha verde-escuro, e após adições sucessivas de $0,10 \text{ mg L}^{-1}$ de iso-a-ácidos linhas em verdes-claros. BS3 (**C**): inicialmente sem iso- α -ácidos linha vinho, e após adições sucessivas de $0,20 \text{ mg L}^{-1}$ de iso-a-ácidos linhas laranjas. O gráfico ao lado representa a curva de calibração para a recuperação de iso- α -ácidos, nos extratos de cervejas. Curvas de calibração correspondentes obtidas pelo método de adição padrão. Parâmetros: tampão BR2,0, amplitude: 30 mV ; incremento de potencial: 6 mV ; frequência: 10 s^{-1} 78

Figura 32. Estudo *fingerprint* dos espectros de RMN- ^{13}C dos extratos obtidos a partir de variedades comerciais de lúpulo. 81

Figura 33. (-) ESI -EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 347,1836 do extrato de lúpulo var. Sabro. 84

Figura 34. Proposta de fragmentação do composto anotado de isocohumulona, de iso- α -ácidos 85

Figura 35. (-) ESI -EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 361,2023 do extrato de lúpulo var. Sabro. 86

Figura 36. Proposta de fragmentação do composto anotado de isohumulona/isoadhumulona, de iso- α -ácidos. 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Variedade Taxonômica de <i>Humulus lupulus</i> caracterizada por Small (1978).	25
Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN- ^{13}C dos carbonos da fração de α -ácidos do lúpulo e dos iso- α -ácidos correspondentes obtidos pelo processo de isomerização.....	53
Tabela 3. Otimização dos parâmetros experimentais na técnica VOQ para a mistura dos iso- α -ácidos.	65
Tabela 4. Parâmetros da curva analítica na voltametria de onda quadrada da análise de iso- α -ácidos.	68
Tabela 5. Comparação dos valores de IBU das amostras de cervejas na técnica espectrofotométrica com absorbância em 275nm, entre os valores declarados pelos fabricantes e obtidos pelo método.....	74
Tabela 6. Valor de absorbância da amostra BS4 no comprimento de onda de 275 nm e IBU.	74
Tabela 7. Resultados de IBU (mg L^{-1}) para três amostras de cerveja analisadas pelo método eletroquímico (eletrodo folha de grafite) e espectrofotometria (275 nm).	79
Tabela 8. Proposta de anotação dos principais compostos presentes nas amostras de (1) extrato de lúpulo, (2) α -ácidos isolados, (3) iso- α -ácidos, BS1, BS2 e BS3.	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PNs	Produtos Naturais
CLAE	CLAE-EM/EM
EM/EM	Espectrometria de massas sequencial
IHGC	<i>International Hop Growers' Convention</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
IBU	<i>International Bitterness Unit</i>
EBC	<i>European Brewing Convention</i>
IES	Fonte de ionização por eletrospray
TMS	Tetrametilsilano
VC	Voltamograma Cíclico
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
BR	Britton Robinson

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Lúpulo (<i>Humulus</i>).....	20
2.1.1	<i>Origem</i>.....	20
2.1.2	<i>Classificação taxonômica e aspectos botânicos</i>.....	20
2.1.3	<i>Gênero</i>	21
2.1.3.1	<i>Humulus japonicus</i>	21
2.1.3.2	<i>Humulus yunnanensis</i>	22
2.1.3.3	<i>Humulus lupulus</i>	23
2.1.3.4	<i>Variedades Humulus Lupulus</i>.....	24
2.1.4	<i>Composição Química</i>.....	26
2.1.4.1	<i>Óleos essenciais</i>.....	27
2.1.4.2	<i>Resinas macias</i>.....	29
2.1.4.2.1	α-ácidos	30
2.1.4.2.2	β-ácidos	33
2.2	Cerveja.....	35
2.2.1	<i>Contextualização da cerveja</i>.....	36
2.2.2	<i>Processo de Produção</i>.....	37
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo Geral.....	39
3.2	Objetivos Específicos	39
4	METODOLOGIA.....	40
4.1	Materiais.....	40
4.1.1	<i>Instrumentos</i>	40
4.1.2	<i>Reagentes e Solventes</i>.....	40
4.2	Preparo dos extratos de lúpulos	41
4.3	Isolamento de fração de α-ácidos e caracterização.....	42
4.4	Isomerização de α-ácidos e caracterização.....	44
4.5	Determinação do IBU por meio da espectrofotometria ultravioleta e visível (UV-vis)	46
4.6	Obtenção de iso-α-ácido das amostras de cervejas	46
4.7	Preparo das amostras de iso-α-ácidos, α-ácidos e cerveja comercial para análise	

	eletroquímica.....	48
4.8	Análises eletroquímicas	49
4.9	Caracterização por CLAE-IES-EM/EM das amostras.....	50
4.10	Caracterização por RMN das amostras.	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	Obtenção do extrato de lúpulo.....	51
5.2	Obtenção de α -ácidos e caracterização.....	51
5.3	Obtenção de iso- α -ácidos e caracterização.....	52
5.4	Estudo eletroquímico do perfil de iso- α -ácidos e dos α -ácidos e desenvolvimento de método de análise eletroquímica	53
5.4.1	<i>Escolha do eletrodo.....</i>	53
5.4.2	<i>Caracterização eletroquímica dos iso-α-ácidos e dos α-ácidos</i>	54
5.4.3	<i>Estudo de eletrólito suporte</i>	57
5.4.4	<i>Estudo de pH.....</i>	58
5.4.5	<i>Otimização dos parâmetros de Voltametria de Onda Quadrada.....</i>	60
5.4.5.1	<i>Amplitude dos pulsos de potenciais</i>	61
5.4.5.2	<i>Incremento de Varredura de Potencial (Incremento de Potencial)</i>	62
5.4.5.3	<i>Frequência: modulação do pulso</i>	63
5.5	Parâmetros voltamétrico do método analítico	65
5.5.1	<i>Curva Analítica.....</i>	65
5.6	Determinação de iso- α -ácidos em amostras de cervejas no método eletroanalítico e no método espectrofotométrico.....	68
5.6.1	<i>Resposta voltamétrica de amostra de cerveja diluída</i>	68
5.6.2	<i>Estudo de Interferentes.....</i>	70
5.6.3	<i>Método espectrofotométrico na determinação do amargor em cerveja.....</i>	73
5.6.4	<i>Avaliação do IBU de amostra de cerveja em etapa anterior a adição de lúpulo nos métodos eletroanalítico e espectroscópico</i>	74
5.6.5	<i>Método eletroanalítico na determinação de iso-α-ácidos em amostras de cervejas..</i>	76
5.7	Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear	79
5.8	Caracterização dos lúpulos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)	82
6	CONCLUSÃO	88
	REFERÊNCIAS.....	89
	APÊNDICE	102

1 INTRODUÇÃO

Os Produtos Naturais (PNs) possuem uma complexidade química significativa, oriundos dos metabólitos primários e secundários, gerando diversas características estruturais singulares. Nesse cenário, o uso de métodos analíticos, como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e a Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas Sequencial (CLAE-EM/EM), é essencial para a caracterização, anotação e identificação desses compostos (Wolfender *et al.*, 2019).

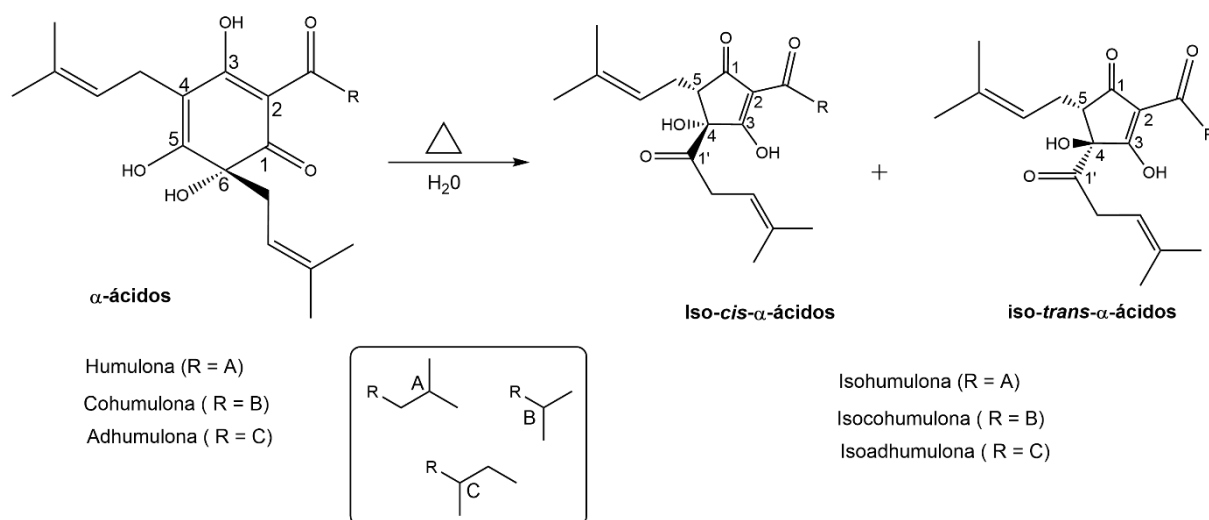
As técnicas de RMN e CLAE-EM/EM na área de PNs são fundamentais, pois fornecem informações estruturais detalhadas sobre os PNs. Isso possibilita uma investigação detalhada sobre a composição química dos organismos vivos, de forma isolada ou presentes em misturas. Dessa forma, a técnica de RMN pode ser utilizada em estratégias de *fingerprint* metabólico, permitindo a comparação global entre amostras sem precisar identificar individualmente todos os sinais e a técnica de CLAE-EM/EM por sua vez, apresenta alta sensibilidade e seletividade, sendo amplamente utilizada para a análise de metabólitos em matrizes complexas (Salem et al., 2020).

O lúpulo (*Humulus lupulus*), foi selecionado para o estudo de seus metabólitos especializados, utilizando as técnicas analíticas, mencionadas anteriormente. Dessa forma, o lúpulo é uma matéria-prima essencial na produção de cerveja, desempenhando um papel fundamental na definição do aroma, sabor e estabilidade da bebida, contribuindo assim para um perfil sensorial mais agradável (Klimeczak; Cioch-Skoneczny, 2023). Sua influência sensorial está principalmente associada à presença de ácidos amargos (chamados de α -ácidos), que são compostos característicos produzidos pela planta. Esses compostos são biossintetizados nos cones femininos, especificamente nas estruturas da glândula lupulina, juntamente com outros constituintes, como óleos essenciais, flavonoides e metabólitos relacionados. Juntos, esses compostos determinam as propriedades aromáticas e gustativas do lúpulo (Kowalska *et al.*, 2022). Assim a grande diversidade de variedades de lúpulo atualmente disponíveis no mercado permite a formulação de diferentes estilos de cerveja, resultando em uma ampla gama de perfis aromáticos e sensoriais.

Durante o processo de produção da cerveja, os α -ácidos sofrem isomerização térmica, convertendo-se em seus respectivos iso- α -ácidos, conforme ilustrado na Figura 1. Os iso- α -ácidos são mais solúveis em água e são diretamente responsáveis pela percepção de amargor na cerveja. Cada α -ácido pode dar origem a dois diastereoisômeros (*cis* e *trans*), resultando em até seis iso- α -ácidos ao final do processo de isomerização. Estudos indicam que os iso- α -ácidos *cis*

contribuem de forma mais significativa para o amargor da cerveja devido à sua maior estabilidade estrutural (Durello; Silva; Bogusz, 2019; Jaskula-Goiris; Aerts; De Cooman, 2010).

Figura 1. Isomerização de α -ácidos do lúpulo em iso- α -ácidos, no processo cervejeiro.



Fonte: A autora.

A determinação do amargor da cerveja é realizada por técnica espectrofotometria, sem a presença de um padrão, precedida por uma etapa de extração em meio ácido utilizando isooctano, o que permite a transferência dos iso- α -ácidos da fase aquosa para a fase orgânica. Nessas condições, os compostos apresentam absorvância em 275 nm (Bishop, 1967), e o valor de IBU é calculado com base na absorvância medida. Por definição, 1 IBU (*Internacional Bittners Unit*) corresponde a 1 mg L⁻¹ de iso- α -ácidos presentes na cerveja, assim, um aumento na concentração desses compostos resulta diretamente em um maior amargor percebido na bebida (Hunter; Dompkowski, 2018; Klimczak; Cioch-Skoneczny, 2023).

Embora o método espectrofotométrico seja amplamente utilizado para a determinação de iso- α -ácidos, outras técnicas analíticas, como a CLAE-EM/EM, também podem ser empregadas (Jaskula *et al.*, 2007). No entanto, esses métodos são mais complexos e exigem o uso de padrões analíticos de referência para garantir uma quantificação precisa.

Métodos eletroanalíticos têm surgido como alternativas promissoras para a determinação de compostos bioativos, permitindo a avaliação direta do comportamento redox de moléculas de interesse (Corrêa-Ribeiro *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2019). Dentre os materiais empregados como sensores eletroquímicos, as folhas de grafite destacam-se pelo

seu excelente desempenho, decorrente de sua elevada condutividade elétrica, sensibilidade, flexibilidade mecânica e baixo custo (Silva *et al.*, 2019). A superfície das folhas de grafite é constituída por camadas de carbono pirolítico, que conferem alta condutividade elétrica e baixa corrente de fundo. Essas características ampliam sua aplicabilidade em diversos campos, incluindo o desenvolvimento de biossensores, dispositivos de armazenamento de energia e capacitores eletroquímicos (Marra *et al.*, 2024).

O presente estudo teve como objetivo investigar o perfil eletroquímico de iso- α -ácidos utilizando um eletrodo de folha de grafite e determinar o índice de amargor de cervejas comerciais selecionadas, bem como realizar o estudo *fingerprint* dos metabólitos presente em diferentes extratos de lúpulos comerciais, utilizando RMN ^1H e ^{13}C e confirmar as presenças dos principais compostos de interesse anotados por CLAE-EM/EM.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lúpulo (*Humulus*)

2.1.1 Origem

O lúpulo é cultivado em diversos países ao redor do mundo. Pesquisas indicam que o lúpulo teve origem na China. Uma análise dos cromossomos de certas plantas revelou que os lúpulos europeus da mesma espécie são diferentes dos lúpulos da China. Além da análise realizada, também foram examinados os aspectos morfológicos do lúpulo asiático e americano (Neve, 1991).

No entanto, há registros de que frutos de lúpulos isolados foram encontrados na Europa, antes da Idade Média. Acredita-se que isso se deva ao seu uso na produção de cerveja (Behre, 1999). De acordo com Korpelainen e Pietilainen (2021), há estudos que sugerem que a expansão do lúpulo pela Europa aconteceu após a última glaciação, sem a participação humana na migração. Outra hipótese é a de que os colonizadores finlandeses introduziram o lúpulo na Europa. Dessa forma, existem diversas teorias acerca da origem do lúpulo (Korpelainen; Pietiläinen, 2021).

A primeira referência ao lúpulo foi realizada por Pliny, descrevendo-o como uma planta ornamental para os romanos. A denominação feita por ele, sobre *Lupulus* é derivada do latim *lupus* (lobo), no qual se desenvolve trepando nos salgueiros. A palavra hop em inglês origina-se do anglo-saxão hoppan, que significa escalar. Não há registro da origem do nome *Humulus*, porém acredita-se que derive do latim *humus*, referindo-se ao solo fértil e úmido onde a planta se desenvolve (Grieve, 1971).

2.1.2 Classificação taxonômica e aspectos botânicos

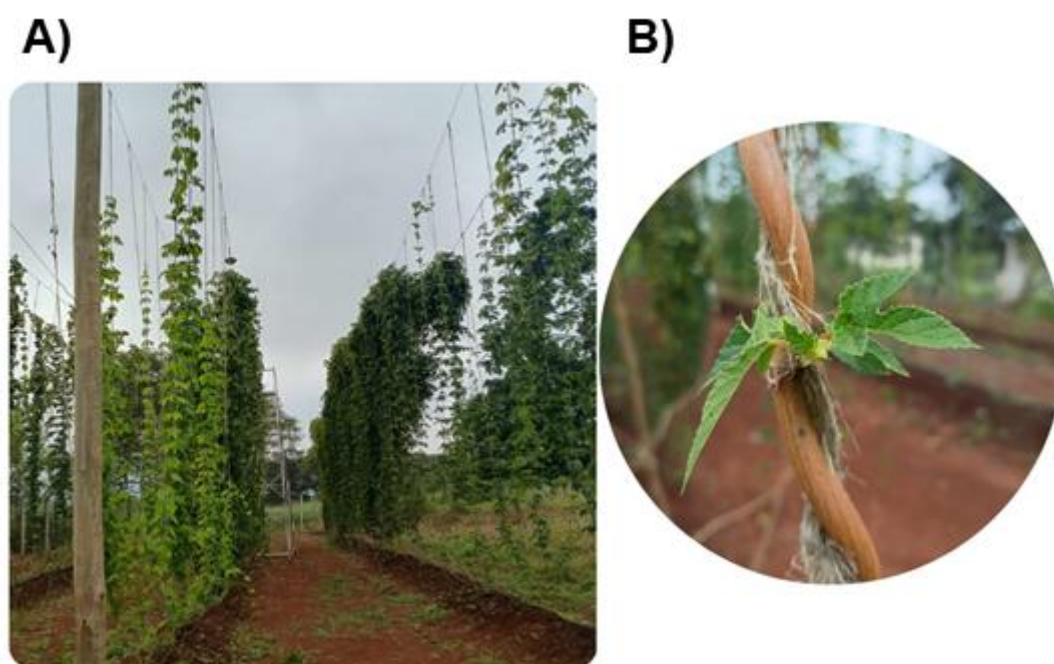
O *Humulus lupulus* pertence a classe Magnolopsida, subclasse da Hamamelididae, das ordens das Rosales, família Canabaceae e gênero *Humulus* (Carbone; Gervasi, 2022). A família Cannabaceae abrange 10 gêneros de planta, sendo os mais conhecidos o *Humulus* e *Cannabis*, algumas características similares desses gêneros são grãos de pólen triporados, sobreposição na estivação floral e perianto persistente (McPartland, 2018). O interesse econômico no gênero *Cannabis* é a sua utilização na formulação de medicamentos, e em relação ao *Humulus* é a sua

introdução na cerveja que confere amargor e como consequência agrega valor ao produto (Fu *et al.*, 2023).

2.1.3 Gênero

O gênero *Humulus* compreende três espécies: *Humulus lupulus*, *Humulus japonicus* e *Humulus yunnanensis*, que tem por característica plantas do tipo trepadeira, capazes de se enrolar em espiral ao redor de suportes ou outras plantas, como mostra a Figura 2. São plantas dioicas, caracterizada por flores femininas e masculinas separados. As espécies podem apresentar ciclo de anual ou ciclo de vidas longos (perenes) (Small, 1978).

Figura 2. A) Plantação de lúpulo se desenvolvendo em cordas e em B) ampliação da planta e folha de lúpulo.



Fonte: A autora.

2.1.3.1 *Humulus japonicus*

O *Humulus japonicus* é uma espécie nativa do Japão, e se encontra distribuída no leste da Ásia, também encontrado na Coreia do Sul, Oriente Russo, América do Norte. e Europa. Na Europa a sua plantação é desde 1886, e a sua disseminação ocorreu a partir dos jardins que eram plantadas, iniciando a aparições da espécie em territórios como Itália, Hungria, Áustria,

República Tcheca, França, Alemanha, Grã-Bretanha, Romênia, Eslovênia, Suíça e Ucrânia (Balogh; Dancza, 2008).

Com característica e ser uma planta trepadeira anual, onde tem todo o ciclo de vida da germinação até a sua morte, com períodos de vidas curtos. Contêm pelos rígidos, folha verde-claro podendo ter de 5 a 7 lóbulos dentadas, inflorescência dos cones menor de 1 cm. Sua principal característica é não produzir glândulas lupulinas (Balogh; Dancza, 2008; Small, 1978).

Alguns estudos apontam diversas aplicações para o *Humulus japonicus*, como para tratamento de antioxidante e antienvelhecimento, que apresentaram resultados promissores para desenvolver medicamentos, sendo necessário estudos mais complexos em humanos e animais (Sung *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2022). O estudo utilizando extrato aquoso de *Humulus japonicus* para melhorar o declínio cognitivo e perda de memória por uso da escopolamina, *in vivo*. Utilizaram extrato e lúpulo em camundongos idoso em que observaram a melhora em reconhecerem objetos e aprendizagem espacial (Kim *et al.*, 2025).

Extratos etanólicos de *Humulus japonicus*, apresentou um teor de compostos fenólicos que melhora a atividade antioxidante, aprofundando em trabalhos que utilizam de células PC12, semelhante a células neurais, em que tem um comportamento neuroprotetor contra estresse oxidativos induzido por peróxido de hidrogênio (Wang *et al.*, 2022). Um estudo avaliou a obesidade utilizando extrato etanólico em células adiposas e camundongos com dieta rica em gordura, e observou que o extrato reduziu o acúmulo de lipídios e estimulou a lipólise, sendo a quebra de gorduras (Sun *et al.*, 2024).

2.1.3.2 *Humulus yunnanensis*

O *Humulus yunnanensis* é uma espécie nativa da China e da província de Yunna, é uma planta pouco explorada pela literatura. O aspecto da folha de *Humulus yunnanensis* contêm de 3 a 5 lóbulos, levemente dentada, inflorescência do cone de 2 a 9 cm, com coloração varia de verde-claro a verde-escuro (Small, 1978).

Em 2018 uma variação do gênero foi patenteada e renomeada pelos Estados Unidos. Uma pesquisa realizada em que ocorreu a hibridização cruzada de *H. yunnanensis* selvagens das regiões Pekong e Himalaia, a patente tem o intuito de proteger ou registrar a variedade Kyra devido alto teor de canabinoides, registrado na planta. Porém não se tem muito estudo sobre esse gênero (Joseph, 2020).

2.1.3.3 *Humulus lupulus*

A espécie de *Humulus lupulus* é o mais estudado e pesquisado entre os três, em razão a seleção e melhoramento genético ao longo dos anos, além da acessibilidade da espécie facilitou a domesticação. Depois de pesquisas relacionadas aos metabólitos especializados e sua utilização na fabricação algumas características foi melhorando ao longo dos tempos, como maior produtividade de cones femininos, maior teor de resinas macias e adaptação ao cultivo (McAdam *et al.*, 2013).

Essa foi a primeira espécie mencionada por Plyny (Grieve, 1971), um estudo realizado por Jaske (2004), fala sobre sua distribuição natural na região do hemisfério norte, Na Europa, Ásia e América do Norte, avaliando a variabilidade genética de 124 plantas pertencentes no banco de dados da Eslovênia (Jakse; Satovic; Javornik, 2004). O ano exato da origem de *Humulus lupulus*, não foi encontrado na literatura (Small, 1978).

O *Humulus lupulus* é uma planta perene, que tem ciclo de vida longo, podendo chegar de 25 a 30 anos, é uma planta de 10 a 18 metros de alturas, as suas folhas de 3 a 5 lóbulos dentados, os cones femininos têm o comprimento de 2,5 a 5 centímetro, e as folhas e cones possui uma coloração verde-médio. Em razão aos metabólitos especializados produzidos em grande quantidade por essa espécie, ela é a mais utilizada na fabricação de cerveja e na área da medicina (Carbone; Gervasi, 2022; Korpelainen; Pietiläinen, 2021).

As espécies de lúpulos segundo Small (1978) se diferenciam entre si principalmente pelas folhas na divisão dos lóbulos, coloração e aspectos, também tem se a diferenciação entre os seus cones femininos, em relação a produção de metabólitos especializados, além de suas formas, tamanhos, como demonstrado na Figura 3, (Small, 1978)

Figura 3. Comparação morfológica das espécies de *Humulus*.

Espécies	Folhas	Cones femininos
<i>H. japonicus</i>		
<i>H. lupulus</i>		
<i>H. yunnanensis</i>		

Fonte: A autora.

2.1.3.4 Variedades *Humulus Lupulus*

As variedades dessas espécies foram reconhecidas através do estudo taxonômico realizado pelo Small (1978), onde foi analisado algumas coleções de *Humulus lupulus*, sobre os aspectos morfológicos e distribuição geográfica, com isso ele reconheceu cinco variedades do *Humulus lupulus*. A Tabela 1 apresenta de forma resumida as diferenças entre as espécies de *Humulus lupulus*.

Tabela 1. Variedade Taxonômica de *Humulus lupulus* caracterizada por Small (1978).

Variedade	Características	Região de Origem
<i>Humulus lupulus</i> var. <i>lupulus</i>	Folhas com serrilhado reduzido, lóbulos moderados, pubescência na nervura central da folha com menos de 20 cm, glândulas secretoras abaxiais limitadas e pecíolos curtos em quantidade reduzida.	Europa e leste da América do Norte
<i>Humulus lupulus</i> var. <i>neomexicanus</i>	Folhas apresentam de 5 a 9 lóbulos bem definidos, com pubescência foliar variável, as glândulas secretoras abaxiais estão mais concentradas na face e os pecíolos são bem desenvolvidos e numerosos, proporcionando melhor sustentação à planta.	Oeste da América do Norte, principalmente na Cordilheira
<i>Humulus lupulus</i> var. <i>pubescens</i>	Folhas menores de 3 lóbulos ou sem, apresentando pubescência foliar bastante desenvolvida, visível a olho nu, glândulas secretoras abaxiais de menor tamanho e pecíolo com densidade elevada.	Centro-Oeste dos Estados Unidos
<i>Humulus lupulus</i> var. <i>cordifolius</i>	Folhas apresentam 3 lóbulos ou formato de coração, com pubescência foliar visível e rígida, glândulas secretoras abaxial são menores do que nas variedades americanas e o pecíolo é longo e espaçado.	Leste da Ásia, em especial no Japão
<i>Humulus lupulus</i> var. <i>lupuloides</i>	Folhas apresentam até 5 lóbulos de formato grande, pubescência foliar moderada, ausente nas nervuras, glândulas secretoras abaxial abundantes e pecíolo curto.	Leste e Centro da América do Norte

Fonte: A autora.

O *Humulus lupulus*, possui mais variedades de lúpulos que são cultivadas para fins comerciais em diferentes regiões do mundo. A importância desses cultivares são as

inflorescências femininas, onde as glândulas lupulinas estão localizadas e são responsáveis pela produção de metabolitos especializados (Jakse; Satovic; Javornik, 2004; McAdam *et al.*, 2013; Neve, 1991). Mundialmente estão registradas cerca de 344 cultivares pela Convenção Internacional de Produtores de Lúpulo (IHGC) (*International Hop Growers' Convention*, 2025), sendo uma organização que representa a indústria mundial do lúpulo e delas 48 também são cultivadas no Brasil, sendo registradas em 2022 (Brasil, 2022).

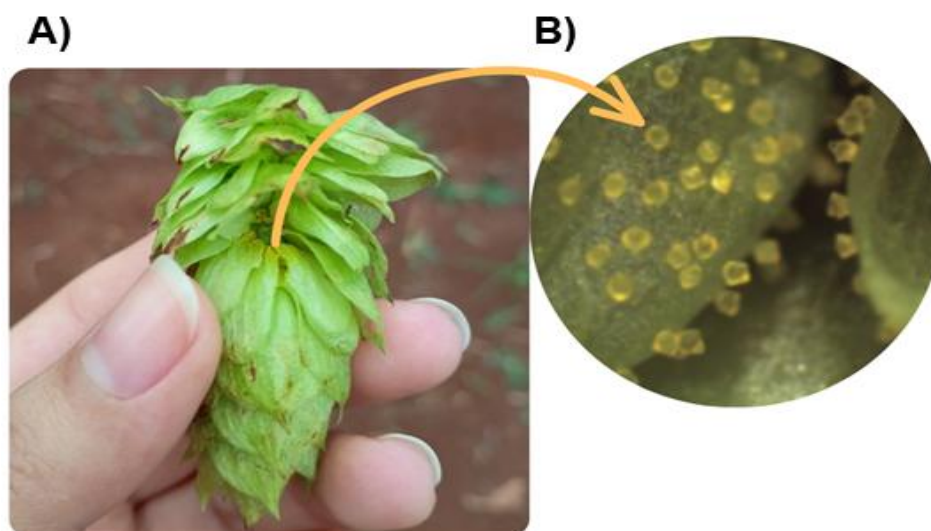
O lúpulo utilizado no trabalho foi Sabro, pertencente a linhagem Neomexicanus (Rheay *et al.*, 2020). Nelson e Cockerell em 1903 aplicaram o nome da variedade Neomexicanus a *H. lupulus* selvagem coletado no norte do Novo México. Eles basearam esse nome devido a diferença na distribuição geográfica, lóbulo foliar e morfologia da bráctea (Tembrock; Mcaleer; Gilligan, 2016).

2.1.4 Composição Química

Este trabalho abordará somente a composição química de *Humulus lupulus*, senda esta utilizada nos estudos posteriores. O *Humulus lupulus* é uma das plantas mais utilizadas do gênero devido as suas diversas propriedades que garantem aplicações em diferentes áreas no âmbito industrial (Karabín *et al.*, 2016). O lúpulo tem cones femininos, que na sua inflorescência possui glândulas lupulinas que produzem os metabólitos especializados, como mostrado na Figura 4. Esses metabólitos especializados têm diferentes compostos como óleos essenciais, polifenóis, proteínas e resinas totais, que se diferenciam pela solubilidade em solventes orgânicos (Chiancone *et al.*, 2023; Hrnčič *et al.*, 2019).

As resinas totais são caracterizadas pela solubilidade em éter dietílico e metanol frio, sendo classificadas em resinas macias e resinas duras. As resinas macias podem ser solúveis em hexanos, no entanto, as resinas duras são insolúveis nesse solvente, mas se mostram solúveis em metanol e éter dietílico (Almaguer *et al.*, 2014; Paniagua-García; Ruano-Rosa; Díez-Antolínez, 2024).

Figura 4. A) Cone feminino da espécie de *Humulus lupulus* e B) Glândulas lupulinas.



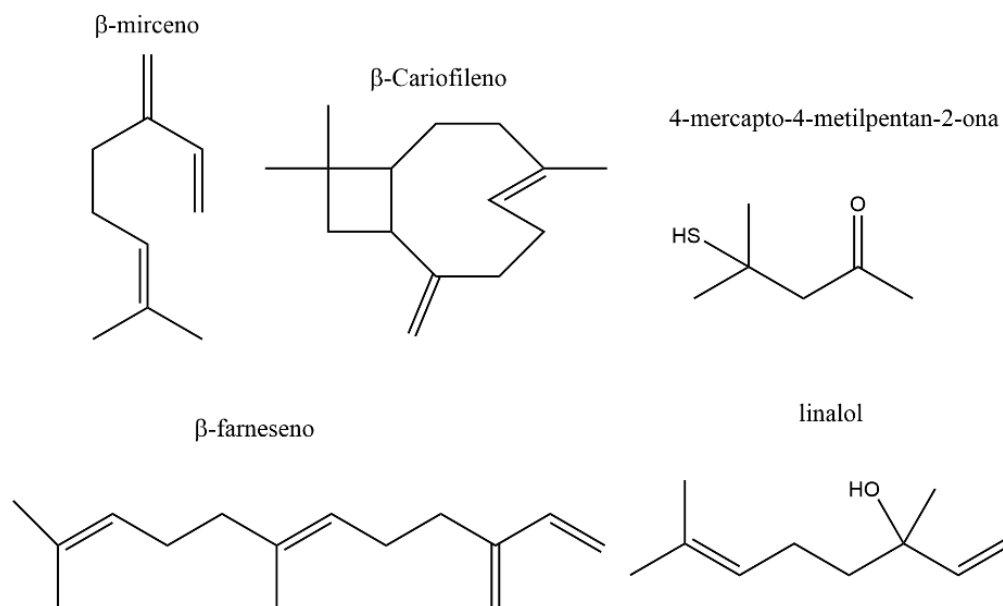
Fonte. A autora.

2.1.4.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos voláteis de baixa polaridade, nos lúpulos secos são encontrados e 0,3 a 5% de óleos essenciais, sendo classificados em três grupos principais: hidrocarbonetos, compostos com enxofre e compostos oxigenados demonstrados na Figura 5, (de Souza *et al.*, 2024; Durello; Silva; Bogusz, 2019).

- a) Hidrocarbonetos principais são os β -mirceno, que confere um aroma herbáceo (plantas frescas) e verde fresco, α -humuleno que possui notas madeiradas, β -cariofileno com notas de especiarias e amadeiradas e β -farneseno com aromas amadeirados, cítrico e doces.
- b) Compostos com enxofre (organossulfurado) principais: são os tióis como 4-mercapto-4-metilpentan-2-ona, com aroma de groselha preta, *S*-metil-2-metil-tiobutanoato, com aromas de legumes cozidos, queijo ou fruta, *S*-metil-tiohexanoato com notas de frutas tropicais.
- c) Compostos oxigenados principais são: linalol com aroma floral e frutado, geraniol com aroma de rosas ou gêranio e acetato de geranila aroma de floral e pinheiro.

Figura 5. Compostos de óleos essenciais de *Humulus lupulus*.



Fonte: A autora

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de desenvolver metodologias para elevar o rendimento da extração de óleos essenciais do lúpulo. Bizaj e colaboradores (2022) utilizou extração por fluido supercrítico, com diferentes solventes, para avaliar melhores condições de extração de compostos de interesse como o xantohumol, composto que apresenta atividade antioxidantes e anti-inflamatórias.

Também foram examinadas certas atividades biológicas dos extratos de lúpulo, com o objetivo de confirmar seu uso tradicional e identificar quais moléculas são responsáveis por essa atividade. Por exemplo, Piasecki e colaboradores (2023) analisaram a atividade de extratos e óleo essencial de seis variedades de lúpulo cultivadas na Polônia contra oito cepas patogênicas humanas de bactérias cocos Gram-positivas. Neste estudo, eles notaram que os extratos possuem uma atividade maior do que os óleos essenciais, e que a cepa mais suscetível a ambos os produtos foi a *Micrococcus luteus* (Piasecki; Biernasiuk; Ludwiczuk, 2023).

O aproveitamento dos resíduos do cultivo de lúpulo também é uma importante área na obtenção de produtos. De Smidt e colaboradores (2025) avaliou o rendimento e a composição de óleo essencial obtido de vegetal fresco de lúpulo (folhas, cones e brácteas), considerado um resíduo agroindustrial, apresentando rendimentos semelhantes aos teores de óleo de lúpulo informados para pellets comercializados no mercado sul-africano. A análise da composição por

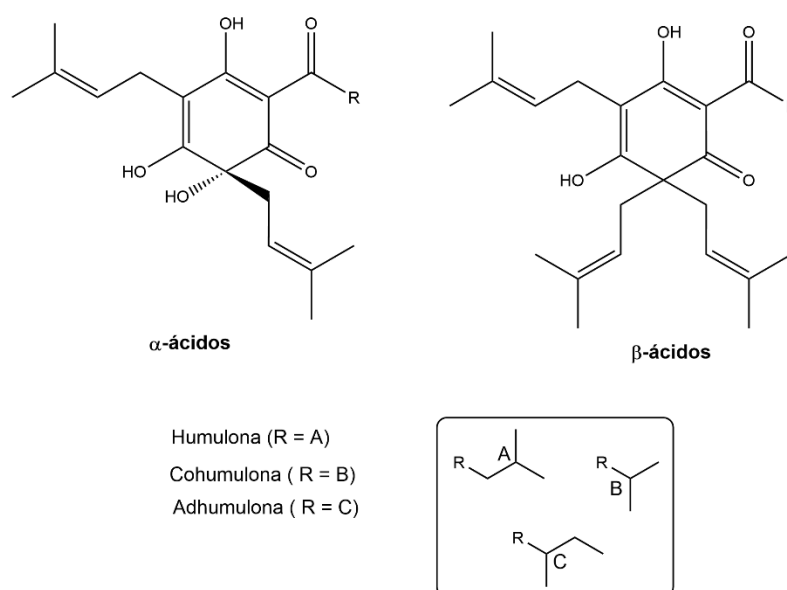
GC-MS mostrou que são ricos em terpenos, com elevadas proporções de mirceno, α -humuleno, β -cariofileno e β -farneseno.

O armazenamento é também uma variável que pode alterar a composição química do lúpulo. Assim, Rutnik e colaboradores (2022) avaliaram as mudanças no teor e na composição química de oito componentes do óleo essencial do lúpulo durante dois anos de armazenamento em quatro condições diferentes (anaeróbica, aeróbica, câmara fria (4 °C) e temperatura ambiente) e na forma de cones e pellets. Os resultados desse estudo indicaram que o armazenamento do lúpulo deve ser realizado em baixas temperaturas e em condições anaeróbicas, sendo que baixos teores de mirceno indicam armazenamento inadequado. Além disso, a estabilidade durante o armazenamento varia significativamente entre as variedades de lúpulo, indicando que os prazos de validade devem ser definidos individualmente para cada cultivar (Rutnik; Ocvirk; Košir, 2022).

2.1.4.2 Resinas macias

São nas resinas macias que estão os principais compostos de interesse do lúpulo, nelas são encontradas as frações α - e β – ácidos, representados na Figura 6. Os α -ácidos são compostos que contribuem para o amargor da cerveja, elevando o seu valor no mercado. Os β -ácidos são compostos que tem atividades antimicrobiana e antioxidantes (Almaguer *et al.*, 2014; Karabín *et al.*, 2016).

Figura 6. Comparação estrutural dos compostos encontrados nas resinas macias α -ácidos e β -ácidos.

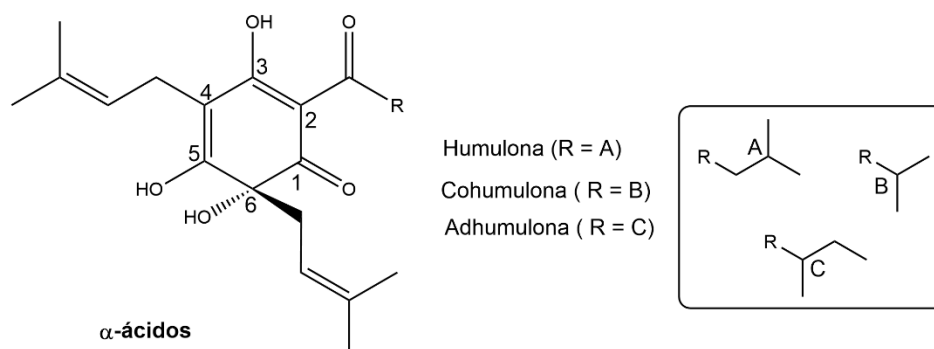


Fonte: A autora

2.1.4.2.1 α -ácidos

Os constituintes mais significativos presentes nos lúpulos são os α -ácidos, sendo chamados de ácidos amargos do lúpulo ou humulonas. Os isômeros majoritários dos α -ácidos, humulonas (35 a 70%), cohumulona (20 a 55%) e adhumulona (10 a 15%) mostrados na Figura 7, levam a formação dos isômeros *cis* e *trans*: - isohumulona; - isocohumulona e isoadhumulona. Os iso- α -ácidos são responsáveis por agregar na intensidade do amargor e auxilia na estabilidade da espuma (Pusecker; Albert; Bayer, 1999). As porcentagens de α -ácidos encontrados no lúpulo podem variar entre de 9 a 10%, a depender da variedade ou local de plantio. Assim como ocorre para os β -ácidos, os α -ácidos se diferenciam pelo substituinte R da carbonila ligada ao C-2 (Durello; Silva; Bogusz, 2019).

Figura 7. Estruturas química dos análogos principais de α -ácidos.

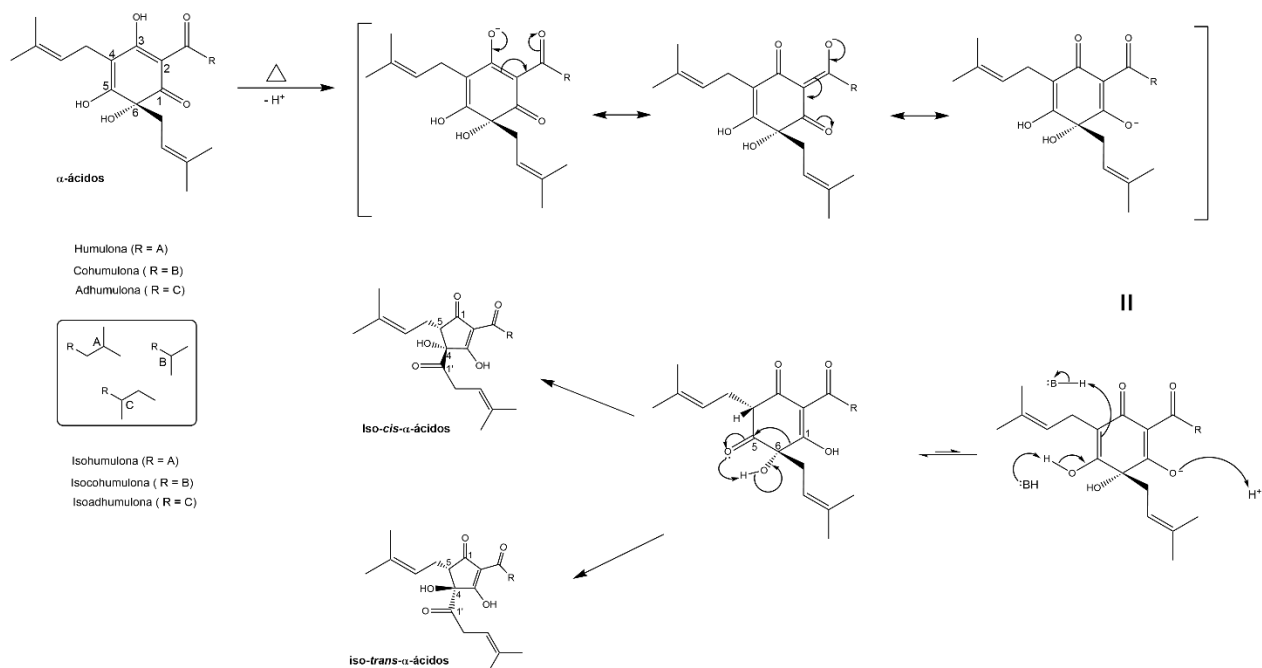


Fonte: A autora.

O lúpulo é principalmente usado no setor alimentício, na produção de cerveja devido ao seu caráter amargo, também tem a contribuição da estabilidade da espuma na cerveja, ligada diretamente ao composto da cohumulona (Nickerson; Williams, 1986). A fração de α -ácidos é solúvel em menor quantidade devido a sua estrutura química. Em razão disso, durante o processo de produção da cerveja, quando o lúpulo é adicionado ao mosto, os α -ácidos passam pelo processo de isomerização em altas temperaturas resultando em produtos de maior solubilidade (Ting; Ryder, 2017).

O processo de isomerização dos α -ácidos envolve a contração do anel de 6 carbonos para um anel de 5 carbonos, essa reação é denominada como rearranjo aciloina. A reação inicia-se com a ionização do sistema β -triketônico. O enolato em C-3 é estabilizado por estruturas de ressonância. Em uma etapa seguinte enol sofre uma cetonização estereosseletiva, gerando uma unidade de aciloina. Nessa etapa, a protonação do ânion intermediário cetonzado ocorre de tal forma que as duas cadeias laterais volumosas assumem a posição *trans* e, portanto, de menor energia. A função álcool terciário da aciloina passa por um rearranjo α -cetol com contração do anel de seis para cinco membros. Esse rearranjo origina os iso- α -ácidos e um novo centro quiral, a Figura 8, ilustra o mecanismo de isomerização. Como a contração do anel não é estereosseletiva, formam-se dois compostos epiméricos de anel de cinco membros, os isômeros *cis* e *trans*, que diferem pela orientação espacial dos substituintes no anel de cinco membros. A maior estabilidade termodinâmica dos *cis*-iso- α -ácidos decorre do menor impedimento estérico entre as volumosas cadeias laterais adjacentes, justificando sua predominância em relação aos isômeros *trans* (De-Clippeleer; Aerts; De-Cooman, 2014).

Figura 8. Mecanismo de isomerização de α -ácidos isolados do lúpulo.



Fonte: Adaptado de Jaskula - Goiris *et al.* 2010.

Os iso- α -ácidos não estão naturalmente presentes no lúpulo, sendo formados pela isomerização térmica dos α -ácidos durante o aquecimento. No estudo de Malowicki e Shellhammer (2005), a cinética dessa reação foi avaliada entre 90 e 130 °C, sendo observado que o aumento da temperatura acelera a formação dos iso- α -ácidos. Os autores também verificaram que tempos prolongados de aquecimento favorecem a degradação desses compostos, especialmente após aproximadamente duas meias-vidas da concentração dos α -ácidos. Os experimentos foram conduzidos em solução tamponada a pH 5,2, representativa do mosto cervejeiro, mantendo-se essa variável constante durante todo o estudo.

De acordo com Verzele e De Keukeleire (1991), os compostos *cis* são termodinamicamente mais estáveis do que os isômeros *trans*, com a razão de 68:32 dos compostos iso-humulonas. A instabilidade dos compostos *trans* tornam eles mais fácil de serem degradados, suscetíveis a sofrerem oxidação e fotodegradação (De-Clippeleer; Aerts; De-Cooman, 2006; Verzele; De Keukeleire, 1991).

Além da contribuição para o amargor e a estabilidade sensorial da cerveja, os α -ácidos e os iso- α -ácidos têm despertado interesse devido às suas potenciais atividades biológicas. Entre as aplicações mais investigadas desses compostos podemos destacar a atividade antimicrobiana, que contribui para a estabilidade microbiológica da cerveja e apresenta

potencial para aplicações em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos (Kiofentzoglou *et al.*, 2025). Estudos demonstram que os iso- α -ácidos atuam como ionóforos em condições ácidas, promovendo a dissipação do gradiente de prótons através da membrana celular bacteriana, reduzindo o pH intracelular e comprometendo o metabolismo microbiano.

Adicionalmente, esses compostos favorecem reações de oxidação associadas ao transporte transmembrana de cargas, induzindo estresse oxidativo e inibindo o crescimento de bactérias deteriorantes, especialmente bactérias Gram-positivas e microrganismos associados à deterioração da cerveja (Schurr *et al.*, 2015). A relevância tecnológica dessas propriedades é reforçada por estudos que demonstram a capacidade dos α -ácidos, iso- α -ácidos e seus derivados de inibir diferentes bactérias deteriorantes da cerveja, contribuindo para a preservação microbiológica da bebida e para o aumento de sua vida útil. Entretanto, a eficácia antimicrobiana varia conforme a estrutura química do derivado de lúpulo, a concentração empregada e a espécie bacteriana avaliada (Michel *et al.*, 2020).

Com isso, as aplicações na indústria cervejeira, compostos derivados do lúpulo vêm sendo amplamente estudados quanto ao seu potencial farmacológico. Nesse contexto, Lempereur e colaboradores (2016) demonstraram que derivados reduzidos dos iso- α -ácidos apresentam atividade biológica promissora contra o câncer de mama, especialmente em modelos de resistência à terapia hormonal, indicando seu potencial como candidatos ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Esses resultados corroboram com o crescente interesse na utilização de compostos do lúpulo como fontes de moléculas bioativas para aplicações além da produção cervejeira (Lempereur *et al.*, 2016).

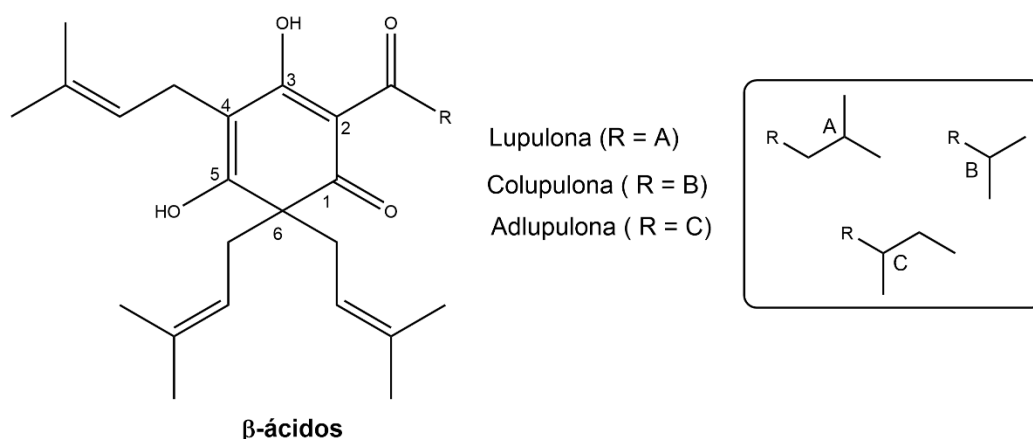
2.1.4.2.2 β -ácidos

Os β -ácidos também são chamados de lupulonas, sendo um dos componentes principais das resinas macias, constituindo cerca de 3 a 8 % da massa total das resinas macias, dependendo da variedade do lúpulo (Durello; Silva; Bogusz, 2019). Porém ele não está associado diretamente ao amargor do lúpulo, a sua estrutura química é pouco solúvel em meio aquoso, e possui pouco caráter amargor, não sendo uma fonte primária para o perfil sensorial da cerveja (Almaguer *et al.*, 2014).

A fração de beta-ácidos são representas por mistura de análogos lupulona, colupulona, adlupulona, prehumulona e poslupulona, sendo as duas últimas pouco encontradas ou relatadas na literatura (Durello; Silva; Bogusz, 2019; Verzele; De Keukeleire, 1991). A estrutura química dos análogos de beta-ácidos se diferencia pelo substituinte lateral à carbonila ligada ao C-2,

mostrado na Figura 9. Os β -ácidos são suscetíveis à oxidação, formando principalmente huluponas. Dessa forma, a concentração dessas substâncias durante o armazenamento pode ser empregada como um marcador do envelhecimento do lúpulo (Krofta; Mikyska, 2014).

Figura 9. Estruturas química dos análogos principais de α -ácidos.



Fonte: A autora

Os β -ácidos do lúpulo têm se destacado como promissores agentes antibacterianos contra *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA). Li e colaboradores (2025) demonstram que esses compostos atuam por múltiplos mecanismos, incluindo a desorganização da parede celular e da membrana citoplasmática bacteriana, aumentando sua permeabilidade e comprometendo a integridade estrutural da célula. Além disso, os β -ácidos interferem no transporte de íons, no metabolismo energético e na homeostase redox, promovendo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos a proteínas essenciais, culminando na morte celular. Além disso, sugere-se também que esses compostos podem afetar o metabolismo de carboidratos de MRSA, reduzindo o fornecimento de energia necessário para o crescimento e a formação de biofilmes. Paralelamente à ação antimicrobiana, os β -ácidos apresentam potencial cicatrizante, favorecendo a recuperação de feridas infectadas por MRSA. Em modelos animais, observou-se redução da inflamação local, controle da carga bacteriana e aceleração da regeneração tecidual, resultando em fechamento mais rápido das lesões. Assim, os β -ácidos atuam como agentes multifuncionais, combinando atividade antibacteriana potente com propriedades anti-inflamatórias e pró-cicatrizantes, características particularmente relevantes para o tratamento de infecções cutâneas causadas por bactérias multirresistentes (Li *et al.*, 2025).

Estudos com extratos de diferentes variedades de lúpulo demonstraram que os β -ácidos estão entre os principais responsáveis pela atividade antibacteriana de lúpulo contra *Staphylococcus aureus*. Frações enriquecidas em β -ácidos, contendo predominantemente colupulona e adlupulona, apresentaram atividade antimicrobiana superior à observada para a xantohumol e para misturas contendo α -ácidos, evidenciando a relevância desses metabólitos como agentes bactericidas (Kolenc *et al.*, 2023).

Os β -ácidos do lúpulo, especialmente a lupulona, têm demonstrado potencial antitumoral em estudos *in vitro* e *in vivo*. Em células metastáticas de câncer de cólon humano (SW620), a lupulona promoveu uma inibição de aproximadamente 70% do crescimento celular após 48 horas de exposição, induzindo apoptose por meio da ativação das vias de sinalização mediadas pelos receptores de morte Fas e TRAIL, além de aumentar a permeabilidade da membrana mitocondrial (Lamy *et al.*, 2007). Em modelo experimental de carcinogênese colorretal em ratos, o tratamento com lupulona reduziu significativamente o número de lesões pré-neoplásicas e diminuiu em até 80% a incidência de tumores, demonstrando seu potencial quimiopreventivo. Posteriormente, Siegel *et al.* (2008) demonstraram que a atividade antitumoral da lupulona também está relacionada à sua ação antiangiogênica. O composto foi capaz de inibir etapas fundamentais da angiogênese, como a proliferação e a migração de células endoteliais humanas, além de reduzir a formação de estruturas capilares em matriz extracelular. Em camundongos tratados com lupulona, observou-se uma redução de aproximadamente 50% na formação de novos vasos sanguíneos. Esses resultados sugerem que a lupulona exerce seus efeitos antitumorais por mecanismos complementares, envolvendo tanto a indução de apoptose em células cancerígenas quanto a supressão da angiogênese, processo essencial para o crescimento e a disseminação tumoral.

2.2 Cerveja

A fabricação da cerveja é uma técnica que evolui ao longo de gerações, onde são utilizados quatro ingredientes essenciais: água, malte, lúpulo e levedura, que desempenham um papel nas características físico-químicas e sensoriais na bebida. Todo o processo passa por fase de aquecimento e resfriamento onde são divididos em moagem, mostura, fervura do mosto fermentação, maturação, filtração e envase (Hornink, 2026).

2.2.1 Contextualização da cerveja

Indícios na literatura sugerem que a cerveja está há muito tempo disseminada em várias partes do mundo, porém com denominações distintas dependendo da localidade ou cultura. Na Suméria já havia relatos por volta de 3000 a.C, falando sobre a produção da cerveja, no mesmo período na antiga Mesopotâmia há uma passagem que cita a cerveja como um alimento para a humanidade e em 1792 a. C. tem-se uma declaração sobre punições relacionada ao preço da cerveja (Hornsey, 2015).

No Egito, no período pré-dinástico 5500 a. C (Hornsey, 2015) já havia consumo e produção de cerveja, descoberta realizada através de sedimentos de cervejas encontrados e comentários reproduzidos na época de como a qualidade da cerveja feita pelos egípcios eram boas. Nessa região, a cerveja era distribuída sem distinção sendo consumida tanto pelos faraós e como pela população em geral. No período do Novo Império do Egito, 1550 – 1070 a.C., a dieta combinada de pão, cerveja e outros itens básicos, revela que a produção de cerveja já era algo comum entre os egípcios (Samuel, 1996).

Na Europa medieval (Hornsey, 2015) era comum o consumo de vinho, culturalmente como forma de diferenciar os gregos de outros povos. A cerveja era vista como algo impuro e frio para os gregos, enquanto o vinho era quente e digno. Uma outra informação interessante sobre a produção de cerveja é que o povo Celta que era um grupo de pessoas que vivia espalhado por toda a Europa, tinha o conhecimento da fabricação de cerveja e considerava a produção de cerveja como uma atividade doméstica e relacionado às mulheres.

A introdução da cerveja no Brasil está diretamente relacionada ao período da ocupação holandesa no Nordeste. Em 1634, durante o governo de João Maurício de Nassau-Siegen, a bebida passou a ser consumida na colônia. Entretanto, com a expulsão dos holandeses em 1654, a produção e o consumo de cerveja praticamente desapareceram do território brasileiro. Somente com a transferência da Corte Portuguesa para o Brasil e a abertura dos portos, em 1808, a cerveja voltou a ser importada regularmente, sobretudo da Inglaterra, tornando-se gradualmente mais acessível à população e contribuindo para o desenvolvimento da cultura cervejeira no país. Esse processo marcou o início da consolidação do mercado cervejeiro brasileiro, que posteriormente seria impulsionado pela instalação das primeiras cervejarias nacionais ao longo do século XIX (Rosalin, 2021; apud Santos, 2005).

2.2.2 Processo de Produção

O processo de produção da cerveja começa na escolha e cultivo da cevada, para garantir um produto de qualidade o malte passa por processo de lavagem e seleção, para avaliar qual tem o melhor perfil. Com a modernização ou a necessidade de se adaptar, outros grãos podem ser usados como trigo, arroz, aveia, milho, centeio e sorgo, esses cereais são adjuntos que podem ser usados dependendo do tipo da cerveja (Cadenas *et al.*, 2021).

O malte é produzido a partir da imersão de grãos selecionados em água, promovendo a absorção de umidade e o início da germinação do embrião presente no grão. Após um período controlado de germinação, o processo é interrompido por meio da secagem, estabilizando o material e resultando na formação do malte. Após a secagem, o malte é triturado, promovendo o rompimento da casca e a exposição do endosperma. Essa etapa facilita a atuação das enzimas formadas durante a germinação, que convertem amidos e proteínas em açúcares fermentescíveis e outros nutrientes essenciais para o processo de fabricação da cerveja (Thesseling *et al.*, 2019).

A brasagem, ou mosturação, é a etapa onde o malte moído é adicionado na água em temperaturas controladas, a fim de converter o amido liberado em açúcares fermentáveis através da ativação das enzimas. Essa etapa do processo determina o tipo de cerveja que será fabricado, portanto é fundamental ter o controle do processo, como o tempo, temperatura (entre 76 - 78°C), pH entre 5 - 6 e qualidade do malte (Palmer, 2006). Após essa etapa, o mosto (produto resultante na etapa de mosturação) é submetido à filtração, processo que separa as cascas dos grãos e demais materiais insolúveis, resultando em uma solução com baixa turbidez e uma coloração que resulta da escolha do cereal selecionado (Wasmuht, 2023).

Após a filtração, o mosto é submetido à fervura para esterilização e a inativação das enzimas. Este processo ocorre com temperaturas próximas a 100 °C por cerca 60 minutos. A fervura se mantém até que a densidade e concentração de açúcares seja alcançada. Após a fervura, realiza-se a separação dos sólidos e materiais particulados presentes na solução por decantação, obtendo-se um mosto mais límpido e adequado para as etapas subsequentes (Coelho-Neto *et al.*, 2020).

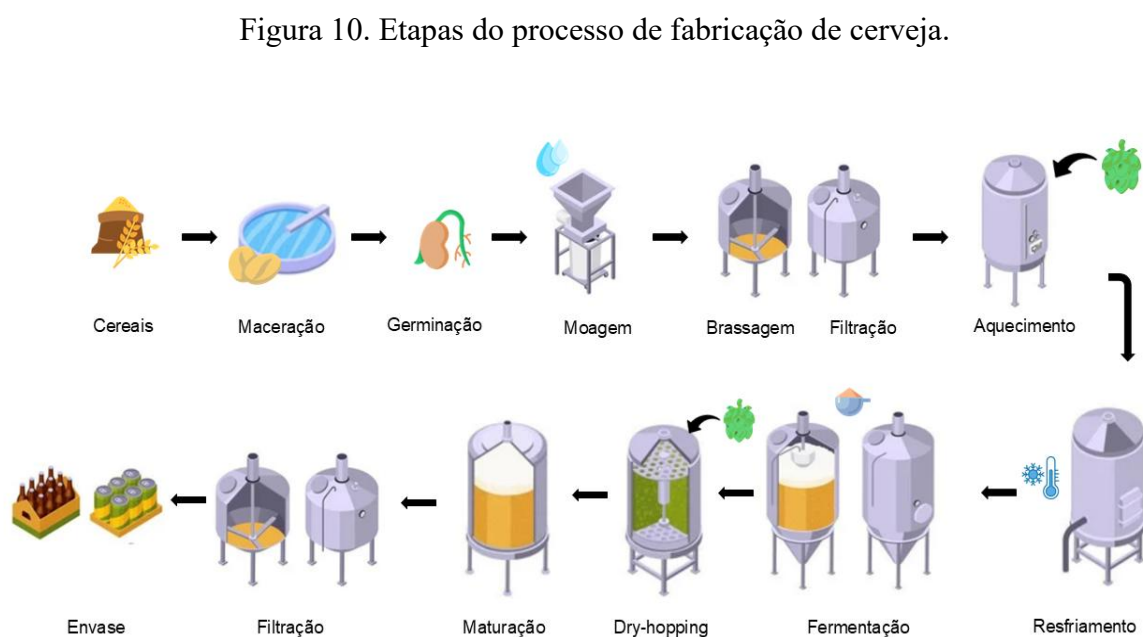
Na etapa de fervura é adicionado o lúpulo, ocorrendo a extração dos compostos amargos, promovendo a diminuição do sabor adocicado do mosto. Os compostos amargos, sendo os α -ácidos são poucos solúveis no mosto, no entanto, o calor promove a reação de isomerização, e os novos compostos formados, denominados de iso- α -ácidos são mais solúveis no meio. O amargor da cerveja é medido através da escala de amargor internacional

em que 1 IBU corresponde a 1 mg/L de iso- α -ácidos (EBC, 2020; Klimczak; Cioch-Skoneczny, 2023).

Após a decantação e remoção dos sólidos, o mosto é resfriado até a temperatura adequada para a fermentação com leveduras do gênero *Saccharomyces*. Nesta etapa do processo ocorre a conversão dos açúcares em etanol, gás carbônico e outros compostos. Em seguida, ocorre a etapa de maturação em que se deixa o produto em um período de repouso controlado (Thesseling *et al.*, 2019).

A maturação é o processo em que a cerveja permanece em baixas temperaturas para que as leveduras consumam substâncias indesejáveis que podem causar sabores ou aromas desagradáveis. Nessa etapa, também ocorre a clarificação, processo no qual as partículas em suspensão sedimentam, além da incorporação de aroma e sabor. Durante a maturação, podem ser adicionados alguns aditivos a fim de modificar o sabor da cerveja, assim como o lúpulo, por meio da técnica denominada *dry hopping*, na qual a presença dos óleos essenciais do lúpulo é transferida para a cerveja resultando na intensificação do aroma sem acrescentar amargor à bebida (Díaz *et al.*, 2022).

Por fim, a bebida é filtrada para a retirada dos resíduos sólidos, e segue para o envase e carbonatação, nessa etapa é adicionado gás carbônico para garantir o nível de gás na bebida, auxiliar na formação da espuma e sensação frescor, obtendo-se o produto final para venda e consumo (Coelho-Neto *et al.*, 2020). Na Figura 10, está a representação esquemática da produção de cerveja.



Fonte: A autora.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar quimicamente lúpulos comerciais por RMN, CLAE-EM/EM e Eletroquímica. Desenvolver uma metodologia eletroanalítica para a quantificação de iso- α -ácidos em cervejas, avaliando sua aplicação no controle de qualidade e sua correlação com o teor de amargor das bebidas.

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar e avaliar a composição dos α -ácidos presentes nos extratos de lúpulo por técnicas cromatográficas e espectroscópicas;
- Desenvolver uma metodologia eletroanalítica para a determinação de iso- α -ácidos em cervejas comerciais;
- Otimizar os parâmetros experimentais da metodologia eletroanalítica visando sensibilidade, precisão e reprodutibilidade analítica;
- Aplicar a metodologia desenvolvida na determinação do teor de iso- α -ácidos em amostras de cervejas comerciais e artesanais;
- Comparar os resultados obtidos pela metodologia eletroanalítica com os valores de amargor expressos em IBU

4 METODOLOGIA

4.1 Materiais

4.1.1 Instrumentos

- Agitador magnético com aquecimento marca IKA modelo C-MAG HS7;
- Balança analítica marca Shimadzu modelo AUW220V;
- Balança analítica marca BEL ENGENTERRIG;
- Manta aquecedora marca FISATOM modelo 202;
- Evaporador rotativo IKA modelo RV10, com banho e aquecimento e controle de temperatura;
- Liofilizador marca TERRONI modelo LS3000;
- Centrifuga marca KINDLY modelo KC5;
- Eletrodo folha de grafite da marca Panasonic;
- Cromatógrafo líquido da marca Agilent modelo Infinity 1260, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução, do tipo Q-TOF, da Agilent no modelo 6520B, com fonte de ionização por eletrospray (IES);
- Coluna cromatográfica da marca Agilent, modelo InfinityLab Poroshell HPH-C₁₈, 2,1 x 50 mm, 2,7 µm;
- Ressonância Magnética Nuclear marca Bruker Ascend™ 400 Avance III HD (9,4 T), operando a 100 MHz, a 30 °C
- Lavadora ultra-sônica modelo USC-750 UNIQUE;
- Potenciostato/galvanostato marca PGSTAT204 modelo Metrohm Autolab BV.

4.1.2 Reagentes e Solventes

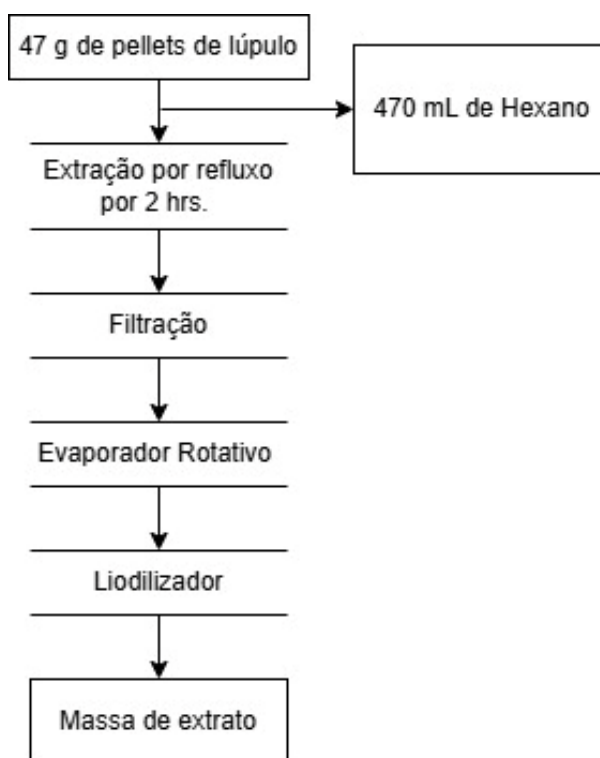
- Os solventes utilizados durante os procedimentos foram: clorofórmio deuterado (CDCl₃) e tetrametilsilano (TMS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Hexano, éter dietílico, etanol, metanol, ácido fosfórico, ácido acético glacial, ácido sulfúrico e ácido clorídrico foram obtidos da Synth (Diadema, SP, Brasil).
- Os reagentes utilizados durante as metodologias foram: acetato de chumbo (II) adquirido da Dinâmica (Indaiatuba, SP, Brasil), carbonato de sódio da Neon (Suzano,

SP, Brasil), sulfato de magnésio anidro da Merck (Darmstadt, Alemanha) e ácido bórico da AppliChem Panreac (Darmstadt, Alemanha). Pellets de lúpulo da variedade Sabro, Magnum, Saaz, Cascade, Polaris, Pacif Gem e Zeus, foram fornecidos pela BarthHaas (Uberlândia, MG, Brasil).

4.2 Preparo dos extratos de lúpulos

Uma massa de 47 g de pellets de lúpulo foi moída e transferida para um balão de fundo redondo juntamente com 470 mL hexano. A mistura foi submetida à extração por refluxo durante duas horas. Após esfriar, o extrato foi filtrado (papel de filtro nº 1, Whatman) e o solvente hexano foi removido sob pressão reduzida utilizando um evaporador rotativo para obter o extrato seco de lúpulo (Rapinel *et al.*, 2020). A Figura 11 representa o fluxograma do método.

Figura 11. Fluxograma do preparo de extrato de lúpulo.

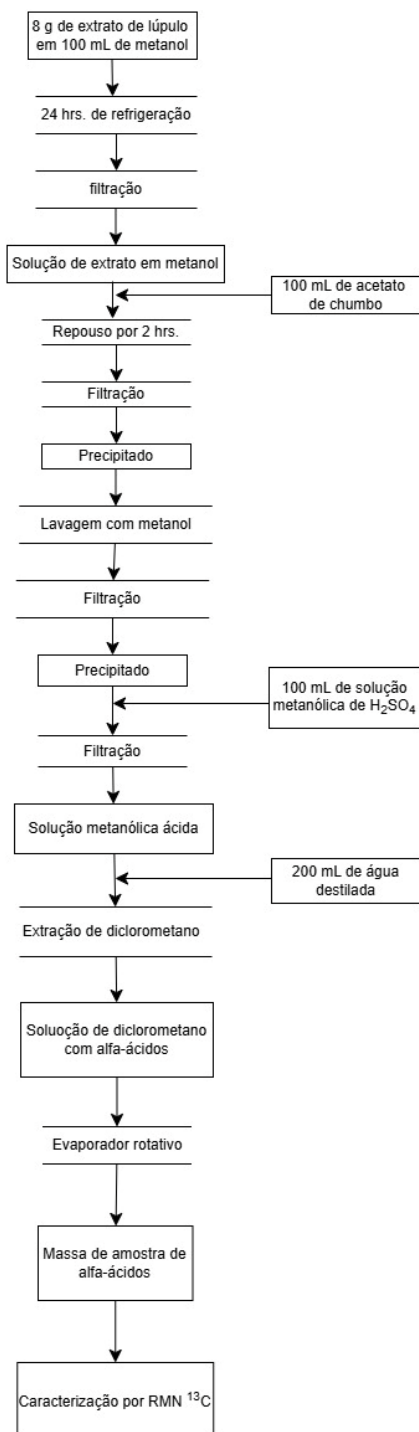


Fonte: A autora.

4.3 Isolamento de fração de α -ácidos e caracterização

Foi dissolvido 8,00 gramas de extrato de lúpulo em 100 mL metanol e mantido sob refrigeração em um frasco de vidro fechado por 24 h. Após esse período, a solução foi filtrada em papel de filtro Whatman nº 1 e uma solução de acetato de chumbo em 100 mL de metanol (4% m/v) foi cuidadosamente adicionada gota a gota até a precipitação completa. A mistura foi deixada em repouso por 2 horas e então filtrada. O precipitado resultante foi lavado com metanol (3 x 50 mL cada) e filtrado. Posteriormente, 100 mL de solução metanólica de ácido sulfúrico (0,1% v/v) foi adicionada ao precipitado. A suspensão foi agitada, filtrada novamente e 200 mL de água destilada foi adicionada (Burton; Stevens, 1965).

Assim, a solução foi submetida à extração líquido-líquido com diclorometano (3 × 50 mL). O solvente foi removido utilizando um evaporador rotativo sob pressão reduzida, obtendo-se uma fração de α -ácido de 2,48 g, obtendo uma pasta marrom-esverdeada (Burton & Stevens, 1965). A caracterização foi realizada RMN – ^{13}C operado com o software TopSpin 5.0.0. a Figura 12 representa o fluxograma do método.

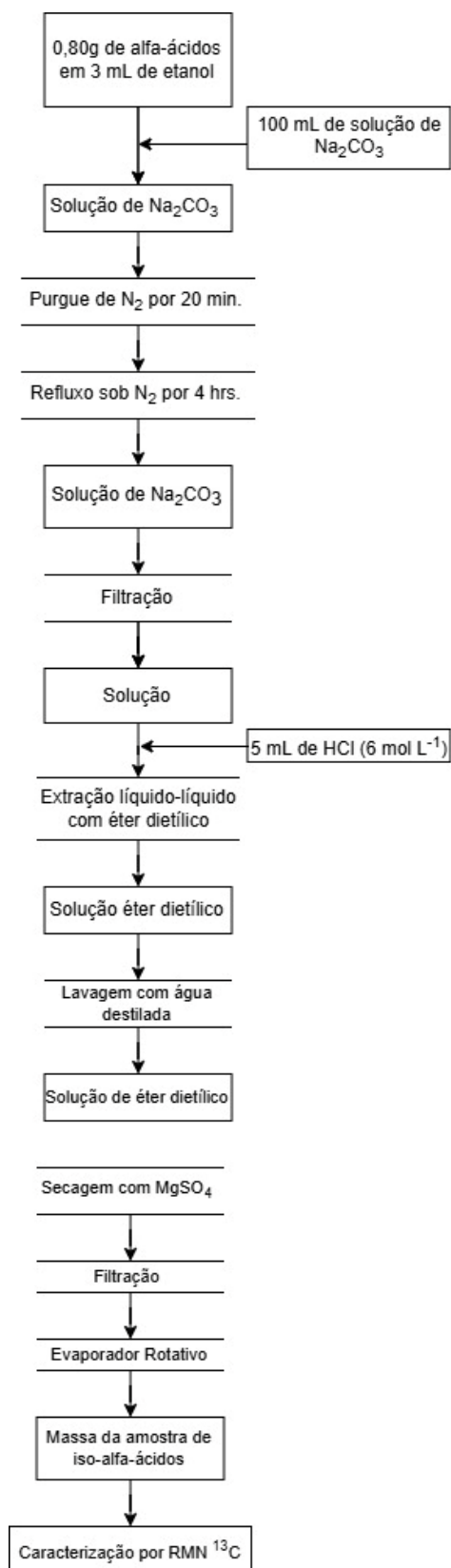
Figura 12. Fluxograma de isolamento de α -ácidos.

Fonte: A autora.

4.4 Isomerização de α -ácidos e caracterização

Em um balão de fundo redondo equipado com agitador magnético (IKA, modelo C-MAG HS7), a fração de 0,80 g de α -ácidos isolados a partir do extrato de lúpulo foi dissolvida em 3,0 mL de etanol. Posteriormente, adicionou-se uma solução de carbonato de sódio (0,1% m/v, 100 mL) e a mistura foi mantida com nitrogênio por 20 min. à temperatura ambiente, seguida de refluxo sob atmosfera de nitrogênio por 4 horas. Após o aquecimento, a solução foi resfriada em banho de gelo, seguida de filtração e acidificada a pH 1 com 5 mL de ácido clorídrico (6,0 mol L⁻¹). A mistura resultante foi submetida à extração líquido-líquido com éter dietílico (3 × 100 mL) (Clarke; Hildebrand, 1965).

Deste modo, a fase orgânica foi lavada com água destilada (3 × 50 mL), seca sobre sulfato de magnésio anidro (2,00 g), filtrada e o solvente foi removido utilizando um evaporador rotativo. O produto resultante foi liofilizado (Clarke; Hildebrand, 1965). A caracterização da fração de iso- α -ácidos foi realizada nas mesmas condições por espectroscopia de RMN de ¹³C. a Figura 13 representa o fluxograma do método.

Figura 13. Fluxograma para a isomerização dos α -ácidos isolados em iso- α -ácidos.

Fonte: A autora.

4.5 Determinação do IBU por meio da espectrofotometria ultravioleta e visível (UV-vis)

As amostras de cervejas selecionadas são estilo Hop Lager - Brasil (BS1), estilo IPA - Argentina (BS2) e estilo Lager âmbar – Espanha (BS3). Além disso, uma amostra de cerveja sem adição de lúpulo (BS4) foi obtida durante a etapa de brassagem. Inicialmente, realizou-se a degaseificação das amostras em banho ultrassônico por 30 min., e posteriormente, 25 mL das amostras de cervejas foram acidificadas com solução de ácido clorídrico (6 mol L^{-1} , 5 mL) e extraída com 50 mL de isooctano. A mistura foi agitada magneticamente por 30 min. e então centrifugada (KINDLY modelo KC5) a 2000 rpm por 15 min. O sobrenadante contendo iso- α -ácidos foi coletado e sua absorbância foi medida a 275 nm usando um espectrofotômetro (EBC, 2020; Coelho-Neto *et al.*, 2020). O índice de amargor foi calculado de acordo com a Equação 1.

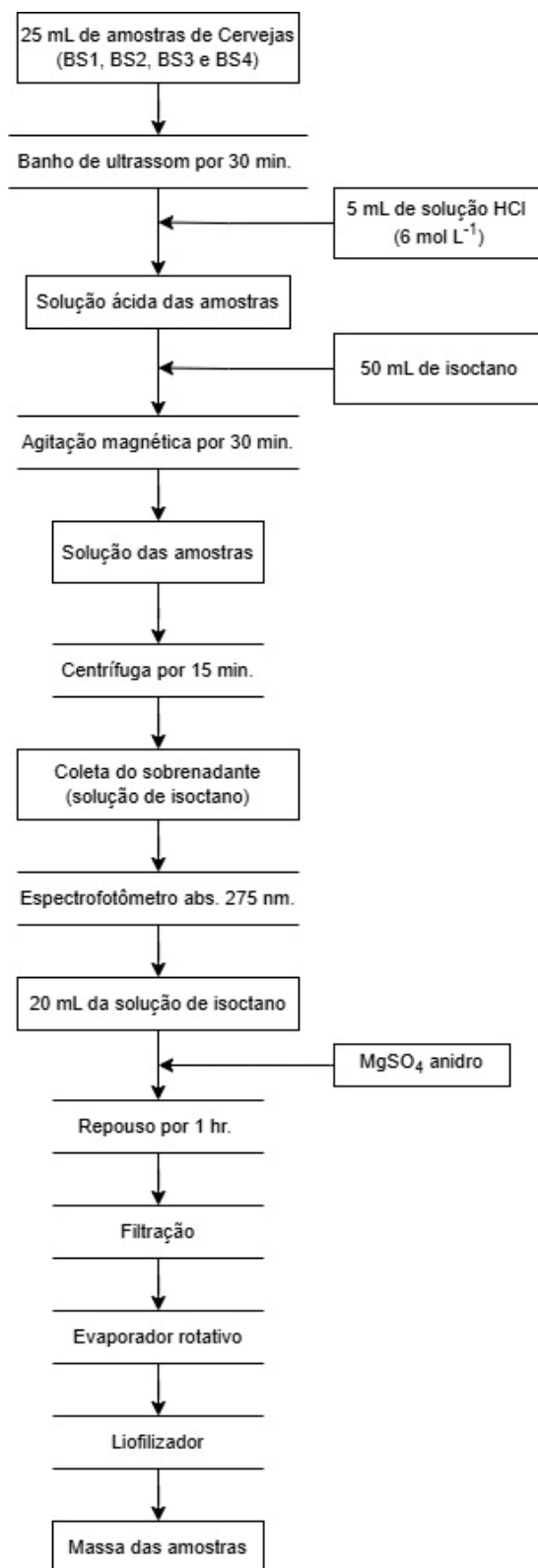
$$IBU = \text{Absorbância medida} \times 50 \quad \text{Eq. 1}$$

4.6 Obtenção de iso- α -ácido das amostras de cervejas

Foi medido 25,00 mL de cada cerveja e submetidos a extração com isooctano para determinação do IBU, de onde foram obtidos os compostos correspondentes aos iso- α -ácidos presentes nas amostras de cerveja. Após a análise espectrofotométrica, alíquotas de 25 mL em isooctano, contendo a mistura de iso- α -ácidos, foram submetidas à secagem com sulfato de magnésio anidro e mantidas em repouso por 1 h. Em seguida, as amostras foram filtradas e o solvente removido sob pressão reduzida em evaporador rotativo. O produto obtido foi posteriormente liofilizado, resultando nos extratos de cerveja em isooctano que contém iso- α -ácidos, a Figura 14, representa o fluxograma do método

Com o objetivo de confirmar a presença dos compostos de iso- α -ácidos após o processo de extração com isooctano, os extratos obtidos foram submetidos à análise CLAE-IES-EM/EM.

Figura 14. Fluxograma de determinação de IBU das amostras de cerveja extraída por isoctano.



Fonte: A autora.

4.7 Preparo das amostras de iso- α -ácidos, α -ácidos e cerveja comercial para análise eletroquímica

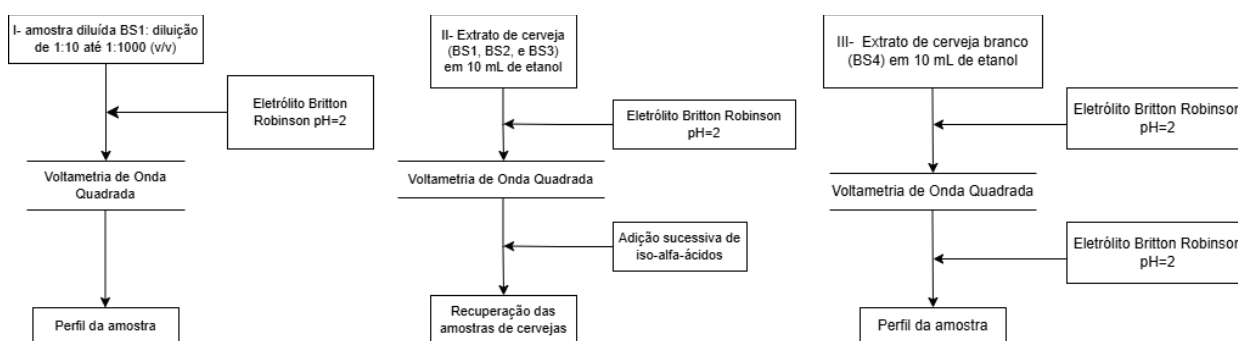
A solução estoque das frações de iso- α -ácidos e α -ácidos foram realizadas em etanol na concentração de 1000 mg L⁻¹.

Para a análise das amostras de cerveja (BS1, BS2, BS3 e BS4), três tipos de soluções foram preparados:

- I. Solução diluída da cerveja: a amostra de cerveja BS1 foi diluída em 1:10 até 1:1000 (v/v) em eletrólito suporte tampão Britton-Robinson (BR) em pH 2,0, diretamente na célula eletroquímica;
- II. Extratos de cervejas com isooctano: os extratos de cerveja de isooctano foram solubilizados em 10 mL de etanol e, posteriormente, diluídos nas proporções de 1:70, 1:350 e 1:70 para BS1, BS2 e BS3, respectivamente, em eletrólito suporte (solução tampão BR, pH 2,0);
- III. Extrato de amostra em branco com isooctano (BS4) – retirado na etapa de brassagem durante a produção da cerveja: o extrato de cerveja de isooctano foi solubilizado em 10 mL de etanol e, posteriormente, diluído na proporção de 1:140 em eletrólito suporte (solução tampão BR, pH 2,0).

A Figura 15, representa em formato de fluxograma o método utilizado.

Figura 15. Fluxograma de preparo das amostras de iso- α -ácidos e α -ácidos para aplicação nas técnicas eletroquímicas.



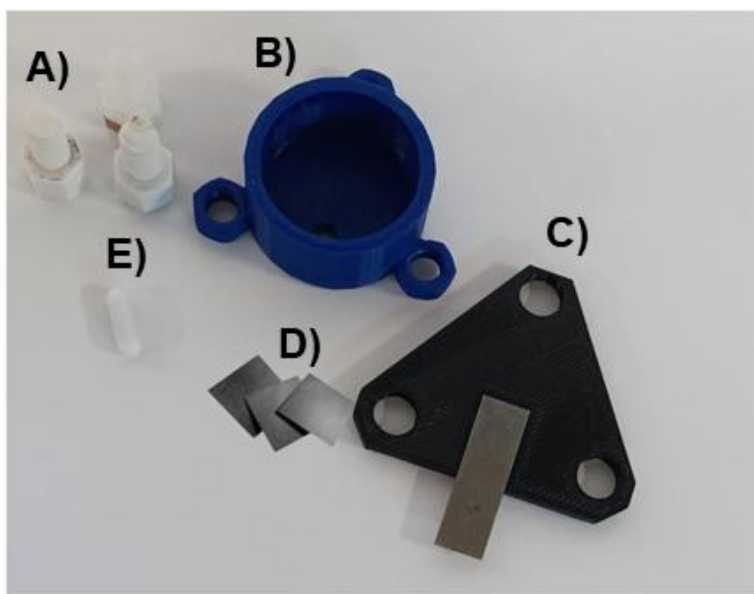
Fonte: A autora.

4.8 Análises eletroquímicas

As análises eletroquímicas foram realizadas em uma célula projetada especificamente para este fim, fabricada por impressão 3D, e utilizando 7,0 mL de eletrólito suporte em cada experimento. A célula foi equipada com um anel de vedação de borracha com diâmetro interno: 0,48 cm, posicionado sobre o eletrodo de trabalho, definindo uma área geométrica de 0,18 cm². Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente em condições de oxigênio dissolvido.

O eletrodo de trabalho consistia em uma folha de grafite pirolítica com condutividade elétrica: 55,6 S cm⁻¹; espessura: 0,07 mm, da marca Panasonic, Mansfield, TX, EUA (Marra *et al.*, 2024b, 2025b). Um fio de platina foi utilizado como contra-eletrodo e um eletrodo de Ag|AgCl|KCl_(sat.) como eletrodo de referência. O eletrólito de suporte foi uma solução tampão de Britton-Robinson (BR) com faixa de pH 2 a 5, preparada pela mistura de ácidos acético, fosfórico e bórico a uma concentração de 0,04 mol L⁻¹, e o pH foi ajustado com solução de NaOH (1,0 mol L⁻¹), para todas as análises teve correção da linha base. A Figura 16 apresenta os materiais utilizados no desenvolvimento de análises eletroquímicas e eletroanalíticas.

Figura 16. Representação da célula eletroquímica e seus componentes A) Parafusos B) Célula eletroquímica 3D C) Base da célula eletroquímica D) eletrodo de folha de grafite e E) Barra magnética.



Fonte: A autora.

As medidas de voltametria de onda quadrada e voltametria cíclica foram registradas utilizando um potenciostato/galvanostato PGSTAT204. O processamento e a análise dos dados foram realizados utilizando o software NOVA, versão 2.1.7.

4.9 Caracterização por CLAE-IES-EM/EM das amostras.

As amostras foram solubilizadas em metanol grau CLAE (5 mg mL⁻¹) e filtradas em filtros de seringa 0,22 µm. O método foi desenvolvido em um equipamento cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Agilent, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução tipo Quadrupole Time of Flight da marca Agilent com fonte de ionização por *electrospray*. A fase móvel foi composta por água acidificada com ácido fórmico 0,1% (A) e metanol grau espectroscópico (B). O gradiente de eluição aplicado foi: 10% B (0 min), 90% B (0-10 min), 98% de B (10 - 17 min). O volume de injeção foi 3 µL, o gerenciador de amostra foi mantido a 20 °C.

A separação cromatográfica foi realizada com um fluxo de 400 µL min⁻¹ usando uma coluna Agilent InfinityLab Poroshell HPH-C₁₈, 2,1 x 50 mm, 2,7 µm em 30 °C. Os parâmetros de ionização foram: pressão de nebulizador de 20 psi, gás de secagem a 8L min⁻¹ a 220 °C e energia de 4,5 KV aplicada ao capilar. O software MassHunter Qualitative 10.0 foi utilizado para processar os dados brutos.

4.10 Caracterização por RMN das amostras.

Foram feitas análises de RMN ¹H e ¹³C, utilizando o equipamento da marca BRUKER modelo Ascend 400, com campo magnético aplicado 9,4δ, a uma frequência de 400 e 100 MHz, respectivamente.

Com isso preparou a solução das amostras de 100 mg em 0,6 mL de clorofórmio deuterado para análise de ¹³C e 20 mg em 0,6 mL de clorofórmio deuterado juntamente com uma massa de $1,17 \times 10^{-4}$ de TetraMetilSilano (TMS) como padrão interno para análise de ¹H. Todas as amostras foram filtradas em filtros de seringa 0,22 µm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção do extrato de lúpulo

O cultivar adquirido foi em formato de pellets, o principal formato que é comercialmente vendido pela marca BarthHaas®, lançado em 2018 pela Hop Breeding Company dos Estados Unidos que criou uma variedade de lúpulo com um perfil sensorial de tangerina, abacaxi e pêssgo e seu aroma intenso de coco e baunilha, com notas de cedro, endro e menta (BarthHaas, 2022), contendo 14,2% de α -ácidos na sua composição, segundo informação da embalagem.

O extrato foi obtido por meio da maceração sob refluxo (Rapinel et al., 2020), na qual a amostra vegetal é mantida em contato direto com o solvente, o que permite uma extração mais eficiente das resinas macias. Uma pesquisa na literatura revelou que esses compostos são solúveis em hexano, ao passo que os demais compostos, identificados como resinas duras, são solúveis em metanol ou éter dietílico (Almaguer et al., 2014). Dessa forma, o extrato obtido apresentou maior enriquecimento em α e β -ácidos, o que favoreceu um maior rendimento das moléculas de interesse.

A massa de extrato bruto obtida foi de 9,80g (rendimento de 20,85%), apresentando coloração marrom esverdeada e aspecto pastoso. Segundo Almaguer e colaboradores (2014) a coloração dos extratos e as propriedades físico-químicas dependem da variedade do lúpulo usado.

5.2 Obtenção de α -ácidos e caracterização

Como mencionado anteriormente, o lúpulo possui resinas macias onde são encontrados os compostos α e β -ácidos, com isso os α -ácidos é um conjunto de moléculas que se diferenciam a partir do substituinte acila ligado ao C-2, no total são cinco análogos de α -ácidos, sendo: posthumulona, prehumulona, humulona cohumulona e adhumulona (Hough *et al.*, 1982). Com tudo, em cervejas são encontrados majoritariamente os três últimos análogos de α -ácidos, devido a maior solubilidade em água, quanto maior a cadeia lateral, menor a solubilidade. Consequentemente, a solubilidade da cohumulona é superior à da humulona e da adhumulona (Protsenko *et al.*, 2020).

A separação dos α -ácidos proposta neste trabalho foi através da precipitação de α -ácidos com acetato de chumbo (Burton; Stevens, 1965). Segundo Verzele e De Keukeleire (1991),

sugere-se que ocorre uma complexação no OH ligado ao C-6 (álcool terciário) dos α -ácidos com Pb^{2+} , uma vez que os beta-ácidos do lúpulo não formam tais sais de chumbo.

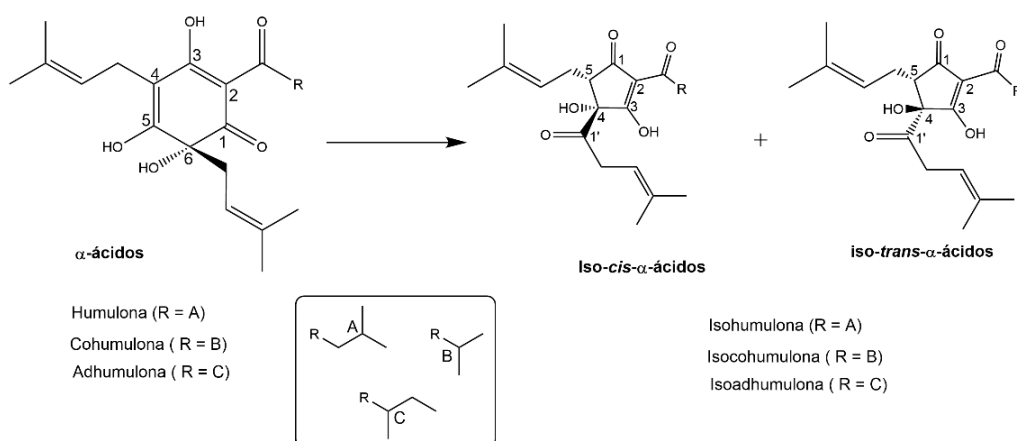
A separação de α -ácidos por esse método resultou 2,48 g de extrato de α -ácidos (rendimento de 31%). O extrato possui uma coloração marrom esverdeada e aspecto viscoso. O extrato foi caracterizado por espectroscopia de RMN de ^{13}C , em que se analisou os deslocamentos químicos característicos de α -ácidos no anel de seis carbonos para os principais compostos de α -ácidos (C-5 e C-6), e o espectro está localizado no Apêndice, FiguraS1.

5.3 Obtenção de iso- α -ácidos e caracterização

A metodologia utilizada neste trabalho do item 4.4, obteve uma fração de iso- α -ácido de 0,34 g (rendimento de 42,5%) apresentando coloração amarela e aspecto viscoso, assim como mencionado na literatura (Clarke; Hildebrand, 1965).

A caracterização dos iso- α -ácidos neste estudo foi realizada por espectroscopia de RMN- ^{13}C . O processo de isomerização envolve uma mudança no estado de hibridização do C-5 de deslocamento químico de 168,2-168,3 ppm, em conformação sp^2 para sp^3 , resultando no C-4 em um deslocamento químico de 87,6-87,7 no isômero *cis* e no isômero *trans* 90,5-90,8 ppm. Em contraste, os α -ácidos com anel de seis carbonos, sofre uma mudança no C-6 de sp^3 com deslocamento de 79,2-79,3 ppm, resultando em C-1' para sp^2 , levando a um deslocamento 205,1- 207,3 ppm, relacionado aos iso- α -ácidos. A Figura 17 apresenta as estruturas químicas de α -ácidos e iso- α -ácidos., e na Tabela 2 os deslocamentos químicos dos compostos, o espectro está localizado no Apêndice, FiguraS3.

Figura 17. Estruturas químicas de α -ácidos e iso- α -ácidos, informados pelo RMN- ^{13}C .



Fonte: A autora.

Tabela 2. Deslocamentos químicos de RMN- ^{13}C dos carbonos da fração de α -ácidos do lúpulo e dos iso- α -ácidos correspondentes obtidos pelo processo de isomerização.

Nº. Carbono	Amostra	Experimental (ppm)	Referência (ppm)
C-5	α -ácido	168,2 168,3*	168,0 169,2**
C-6		79,2 79,3*	77,0 79,2**
C-4	iso- <i>cis</i> - α -ácido	87,6 – 87,7*	87,5-87,6**
	iso- <i>trans</i> - α -ácido	90,5 90,8*	90,5-90,8**
C-1'	iso- <i>cis</i> - α -ácido	203,1-207,3*	206,9**
	iso- <i>trans</i> - α -ácido		

(Khatib *et al.*, 2007)

Fonte: A autora.

Dessa forma, conseqüentemente, esse sinal pode ser usado como um marcador do processo de isomerização. Isso ocorre porque a fração de α -ácido é uma mistura complexa de análogos estruturalmente relacionados que diferem na natureza do substituinte acila na posição C-2, levando à formação de uma mistura correspondente de iso- α -ácidos.

5.4 Estudo eletroquímico do perfil de iso- α -ácidos e dos α -ácidos e desenvolvimento de método de análise eletroquímica

5.4.1 Escolha do eletrodo

No estudo de Oliveira (2010), a folha de grafite foi empregada como sensores eletroquímicos no desenvolvimento de aplicações analíticas, uma vez que, conforme mencionado pelo autor, essa técnica ainda não foi explorada em análises de amostras farmacêuticas. Optou-se por esse material devido às suas propriedades vantajosas, que incluem flexibilidade, resistência elétrica, desempenho mecânico, versatilidade e baixo custo (Oliveira; Munoz; Angnes, 2010).

O desempenho dos eletrodos de folha de grafite incentivou outros pesquisadores a investigar os perfis eletroquímicos de diferentes amostras usando estes eletrodos comercialmente disponíveis, empregando-as como sensores eletroquímicos. Silva e colaboradores (2019) avaliaram diferentes marcas e propriedades e entre elas está o eletrodo de

folha de grafite da marca Panasonic®. Foi analisado o comportamento eletroquímico das marcas na presença de amostras reais como dopamina, catecol, chumbo e cádmio, mostrando elevado desempenho quando comparado com os outros eletrodos de folha de grafite e o eletrodo de carbono vítreo. No estudo de Silva e colaboradores (2019) foi utilizado o eletrodo de folha grafite sem nenhum tratamento prévio na sua superfície, preservando o bom desempenho em conformidade com o relatado. Com base nesse estudo, este trabalho escolheu utilizar o eletrodo Panasonic® e sem pré-tratamento em sua superfície antes das análises (Silva *et al.*, 2019).

5.4.2 Caracterização eletroquímica dos iso- α -ácidos e dos α -ácidos

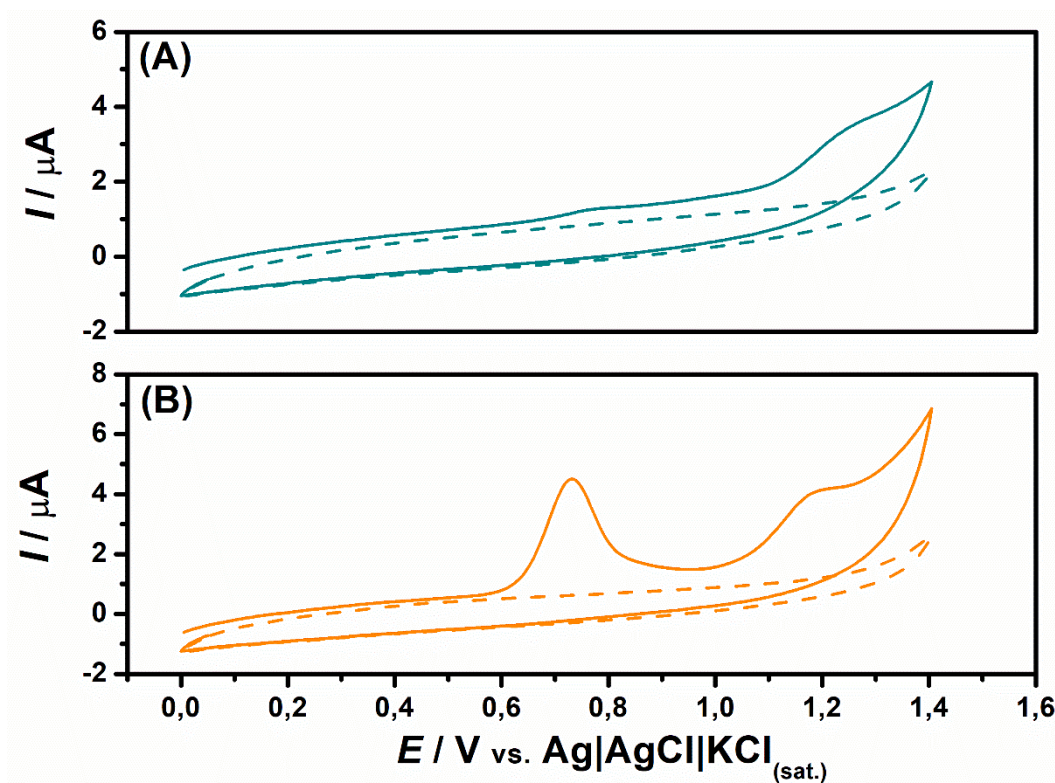
O comportamento eletroquímico dos compostos iso- α -ácidos, que são de particular interesse para a determinação do amargor da cerveja, foi investigado em relação ao seu processo de oxidação, utilizando um eletrodo de trabalho de folha de grafite.

A Figura 18A mostra o voltamograma cíclico (VC) na presença de 20 mg L⁻¹ dos iso- α -ácidos em tampão BR (pH 2). A resposta voltamétrica exibe um sinal de corrente de pico anódico de baixa intensidade correspondentes ao processo de oxidação dos iso- α -ácidos em +1,23 V. Nenhum pico foi observado na varredura voltamétrica reversa, com pico catódico, o que confirma a natureza eletroquimicamente irreversível do processo.

Ao examinar a Figura 18B, que mostra o perfil eletroquímico dos α -ácidos, é possível identificar um comportamento voltamétrico diferente ao observado para os iso- α -ácidos. Neste caso dois picos de oxidação são observados em potenciais diferentes +0,74 e +1,19 V, sendo apresentado em intensidades de correntes diferentes. Para o primeiro processo em 0,74 V é observado um pico anódico bem definido com corrente em 4,5 μ A e para o segundo processo em 1,19 V o pico anódico menos definido e com uma corrente menor, quando comparado ao primeiro pico de oxidação em +0,74 V.

Além disso, nenhum pico foi observado na varredura voltamétrica reversa catódica, o que também confirma processos eletroquímicos irreversíveis. Uma investigação voltamétrica de extratos de lúpulo utilizando eletrodos de platina foi relatada na literatura e resultados semelhantes foram obtidos (Masek *et al.*, 2014). Dois picos de oxidação distintos em potenciais de +0,6 V e +1,1 V, foram descritos e atribuídos aos processos de oxidação dos α -ácidos presentes no extrato. Assim os dados foram consistentes com a literatura, mesmo utilizando outros materiais para a análise eletroquímica.

Figura 18. Voltamogramas Cíclicos usando eletrodo de folha de grafite na presença de (A) iso- α -ácidos (20 mg L^{-1}) e (B) α -ácidos (20 mg L^{-1}) em solução tampão BR (pH 2,0). Parâmetros: Velocidade de varredura= 50 mV s^{-1} , Incremento de potencial = 5 mV . As linhas tracejadas correspondem ao branco.



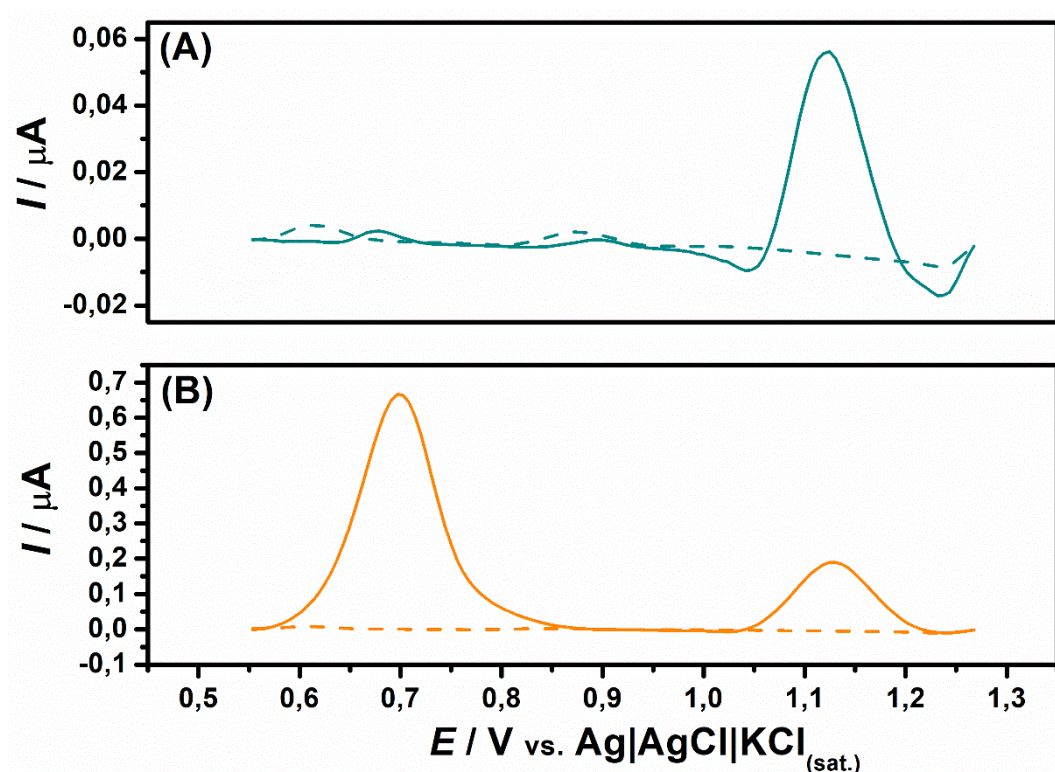
Fonte: A autora.

As reações eletroquímicas dos iso- α -ácidos e α -ácidos foram investigadas utilizando a Voltametria de Onda Quadrada (VOQ), uma técnica mais sensível que a VC, permitindo melhor resolução dos processos de oxidação e maior discriminação entre os sinais eletroquímicos dos compostos. Os voltamogramas obtidos para soluções diluídas de iso- α -ácidos e α -ácidos são mostrados na Figura 19. Para os iso- α -ácidos (Figura 19A), registrou-se um único pico de oxidação em $+1,13 \text{ V}$, o que indica que o processo oxidativo é predominante nessa faixa de potencial. Por outro lado, os α -ácidos (Figura 19B) exibiram dois picos processos de oxidação definidos, com picos em $+0,70 \text{ V}$ e $+1,13 \text{ V}$. Isso indica que pode haver duas etapas de oxidação ou a presença de diferentes grupos eletroativos na molécula.

Além disso, a intensidade de corrente do primeiro pico dos α -ácidos foi consideravelmente maior do que a do segundo, o que indica que o processo de oxidação em torno de $+0,70 \text{ V}$ é o mais eletroquimicamente favorecido nas condições experimentais utilizadas.

O perfil voltamétrico obtido por VOQ indica que os iso- α -ácidos exibem um pico de oxidação bem definido em +1,13 V, o que possibilita sua detecção até mesmo em soluções diluídas. Apesar dos α -ácidos terem mostrado uma intensidade de corrente maior, optou-se pelos iso- α -ácidos para as análises posteriores principalmente por sua maior importância na composição e no amargor da cerveja. Os α -ácidos são isomerizados durante a fervura do mosto, transformando-se em iso- α -ácidos, que possuem maior solubilidade em água e estão presentes em maior quantidade na bebida final (De Keukeleire, 2000). Assim, os iso- α -ácidos são os compostos predominantes que conferem amargor à cerveja e, por isso, constituem os analitos mais apropriados para a criação de um método eletroanalítico (Khatib *et al.*, 2010).

Figura 19. Voltamogramas de VOQ usando eletrodo de folha de grafite na presença de (A) iso- α -ácidos (2 mg L^{-1}) e (B) α -ácidos (2 mg L^{-1}) em solução tampão BR (pH 2,0). Parâmetros: amplitude: 40 mV; Incremento de potencial: 5 mV; frequência: 50 s^{-1} . As linhas tracejadas correspondem aos sinais em branco.



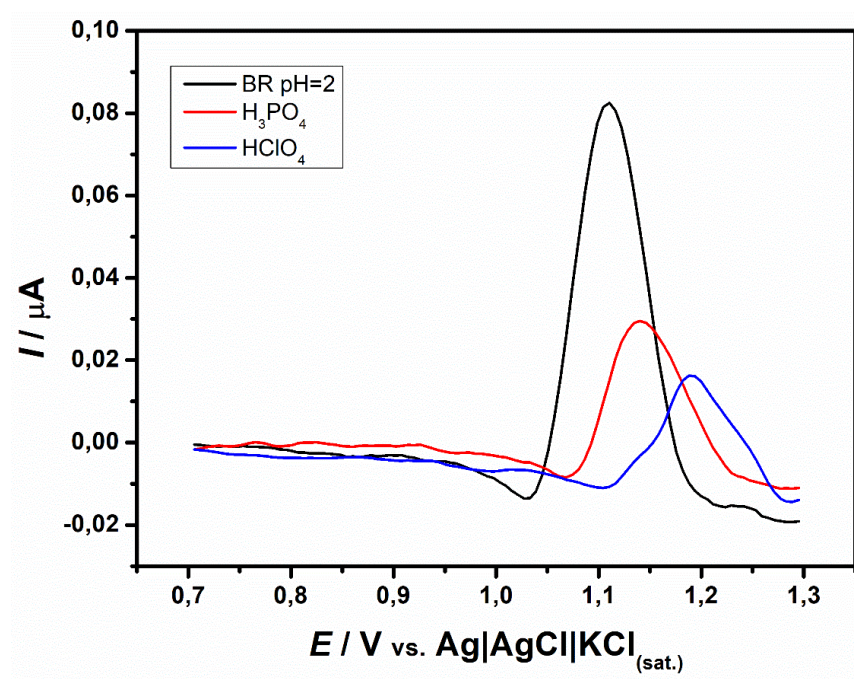
Fonte: A autora.

5.4.3 Estudo de eletrólito suporte

Inicialmente, foi conduzido um estudo do eletrólito de suporte, que consiste em uma solução de elevada força iônica e condutividade elétrica superior à do solvente utilizado. A presença desse eletrólito favorece a condução de corrente na célula eletroquímica, reduzindo os efeitos de migração das espécies eletroativas e melhorando a qualidade do sinal analítico. (Lobo, 1996). A escolha do eletrólito deve selecionar algumas propriedades como alta solubilidade, alto grau de ionização e ser estável química e eletroquimicamente. Há também eletrólitos de suportes como soluções tamponantes, quando é necessário manter constantes o pH durante as análises (Wang, 2000).

Para melhorar o perfil dos iso- α -ácidos, os eletrólitos de suporte escolhidos para esta análise foram: $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$; $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$ e $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ do tampão de BR (pH 2). A Figura 20 apresenta os deslocamentos de potenciais e as correntes obtidas no estudo de eletrólitos. Para a solução de BR2, observou-se um potencial de +1,1 V; para a solução de H_3PO_4 , o potencial foi de +1,15 V; e para a solução de HClO_4 , o potencial foi de +1,20 V.

Figura 20. Voltamogramas utilizando eletrodo de folha de grafite na presença de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ de iso- α -ácidos, para solução tampão $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ BR pH 2; $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_3\text{PO}_4$; $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HClO}_4$. Parâmetros: amplitude: 30 mV; Incremento de potencial: 6 mV; frequência: 10 s^{-1} .



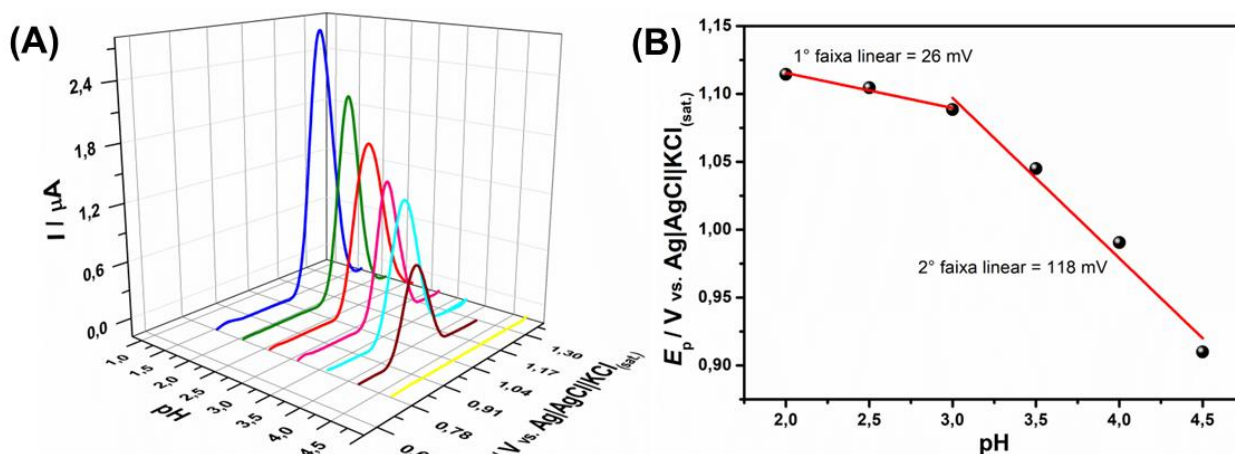
Fonte: A autora.

Com base no comportamento de iso- α -ácidos, para os eletrólitos analisados o tampão BR (pH 2), foi o selecionado visto que a intensidade de corrente para esses eletrólitos é aproximadamente de 0,08 μA , pelo menos 4 vezes maior se comparado com as correntes, dos outros eletrólitos.

5.4.4 Estudo de pH

Após o estudo de eletrólito, no qual foi selecionado o tampão BR (pH 2), foi avaliado o comportamento eletroquímico de iso- α -ácidos do efeito de pH neste eletrólito de suporte, conforme mostra a Figura 21.

Figura 21. (A) Respostas voltamétricas da influência do pH na corrente de pico e no potencial de pico, na presença de iso- α -ácidos (2 mg L^{-1}), com escala de pH de 2,0 – 5,0. (B) Gráfico do potencial de pico (E_p) versus pH. Parâmetros: amplitude: 40 mV; Incremento de potencial: 5 mV; frequência: 10 s^{-1} .



Fonte: A autora.

O perfil eletroquímico da mistura de iso- α -ácidos foi obtido na janela de potencial entre +0,2 e +1,3 V. A Figura 21A exibe os voltamogramas com um pico de oxidação definido na faixa de pH estudada. Avaliando a corrente de pico (I_p), o maior sinal obtido foi em pH 2, indicando condições ótimas de oxidação para iso- α -ácidos. Em maiores valores de pH (≥ 5) não tem um pico de oxidação característico dos iso- α -ácidos. Observe que o potencial de pico (E_p)

e a corrente de pico (I_p) são influenciados pelo pH do eletrólito de suporte, visto que conforme o pH diminui a intensidade de sinal e o potencial aumentam. Portanto, o tampão BR em pH 2,0 foi selecionado para o estudo dos iso- α -ácidos.

A janela de potencial entre +0,2 e +1,3 V permitiu a obtenção do perfil eletroquímico da mistura de iso- α -ácidos. Os voltamogramas com um pico de oxidação definidos na faixa de pH analisada são mostrados na Figura 21A. É possível observar que o potencial de pico (E_p) e a corrente de pico (I_p) são influenciados pelo pH do eletrólito de suporte. Isso ocorre porque, à medida que o pH diminui, a intensidade do sinal e o potencial aumentam. Porém em pH = 5, não há um pico de oxidação característico dos iso- α -ácidos.

A Figura 21B mostra como o pH afeta o potencial de oxidação dos iso- α -ácidos. A relação entre E_p e pH exibe duas regiões lineares diferentes, com inclinações de cerca de 26 e 118 mV pH⁻¹. Esse comportamento indica que as espécies dos iso- α -ácidos envolvidas na reação eletroquímica modificam a cinética e a termodinâmica da transferência de elétrons em função do pH.

A partir da Figura 21B, foi possível determinar a razão entre o número de prótons e elétrons envolvidos no processo redox através da Equação de Nernst (Equação 2) (Compton; Banks, 2025; Lu; Compton, 2014).

$$E = E^{0'} - \frac{0,059m}{n} pH \quad \text{Equação 2}$$

Na Equação 2, m representa a quantidade de prótons e n a quantidade de elétrons participantes do processo redox. Como mostrado na Figura 21B, o potencial de pico (E_p) da oxidação dos iso- α -ácidos se desloca de forma linear para valores menos positivos com o aumento do pH do eletrólito de suporte, variando de cerca de +1,11 V em pH 2,0 a +0,92 V em pH 4,5. Essa relação do potencial com o pH indica que prótons estão envolvidos no mecanismo de oxidação, caracterizando um processo de transferência eletrônica acoplado à transferência de prótons (Compton; Banks, 2025). Nesse caso, a relação linear entre o potencial de pico e pH no intervalo de 2,0 a 3,0 pode ser expressa pela Equação 3.

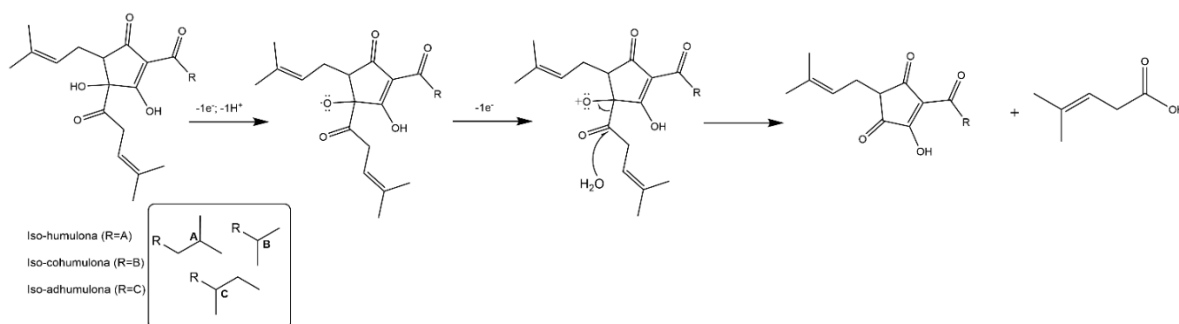
$$E_p (V) = 1.17 - 0.026 \times pH \quad R^2 = 0,964 \quad \text{Equação 3}$$

A inclinação da curva E_p vs. pH (26 mV/pH) é cerca da metade do valor teórico de Nernst (59 mV/pH) (Bard; Faulkner, 2001). Com base nestes dados, o processo redox analisado

envolve a transferência de 1 próton (m) e 2 elétrons (n). Ao analisar a corrente de pico (I_p) em pH = 5, nota-se uma redução significativa do sinal. Isso pode indicar que, nessa faixa de pH, a molécula não possui sítios de oxidação disponíveis para o processo redox.

O mecanismo redox dos iso- α -ácidos durante todo o processo de oxidação ocorre especificamente na região C-4, que apresenta um grupo OH, diretamente ligado a ele, sendo este o principal sítio ativo, conforme mostrado na Figura 22.

Figura 22. Proposta de mecanismo de oxidação das moléculas de iso- α -ácidos.



Fonte: A autora.

A Figura 21B mostra uma segunda inclinação da curva de E_p vs. pH (118 mV/pH), que é o dobro do valor teórico de Nernst (59 mV/pH). Analogamente, o processo redox analisado envolve a transferência de 2 prótons (m) e 1 elétron (n). Esse comportamento pode ser explicado pelo valor de pKa 3,3 (Rudin, 1960), uma vez que a alteração do estado de protonação da molécula pode modificar o mecanismo de oxidação no sítio eletroativo e, consequentemente, há uma mudança na inclinação da reta, como mostrado na Equação 4.

$$E_p (V) = 1.45 - 0.118 \times pH \quad R^2 = 0,970 \quad \text{Equação 4}$$

5.4.5 Otimização dos parâmetros de Voltametria de Onda Quadrada

Os parâmetros da técnica VOQ foram ajustados para proporcionar condições experimentais mais adequadas para os iso- α -ácidos. Os parâmetros de forma: aumento de potencial, modulação de amplitude e frequência, em relação aos testes subsequentes, utilizaram 2,5 mg L⁻¹ de iso- α -ácidos em solução tampão BR 2, sendo cada parâmetro avaliado de maneira univariada.

5.4.5.1 Amplitude dos pulsos de potenciais

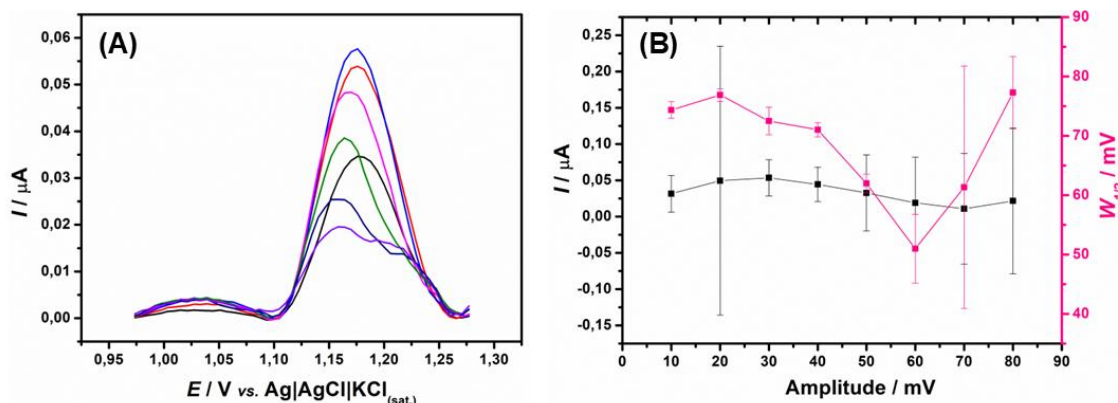
A amplitude representa a altura dos pulsos de potencial empregado sobre a escada de potencial. Este é um parâmetro na técnica pulso que controla a perturbação no sistema eletroquímico durante cada pulso dado. Assim, essa perturbação causa um aumento na corrente de pico (I_p), contribuindo para as reações redox do meio. A amplitude também influencia o perfil do voltamograma, em relação a largura de meia altura ($w_{1/2}$), amplitudes mais altas podem deixar o pico mais largo, reduzindo a resolução entre processos redox distintos (De Souza; Machado; Avaca, 2003).

O estudo de amplitude foi realizado, variando-se a amplitude dos pulsos de potencial entre 10 a 80 mV, e os resultados estão apresentados na Figura 23. Ao analisar os voltamogramas pela Figura 23A, nota-se que o perfil dos iso- α -ácidos perde um pouco a definição do pico para voltamogramas abaixo de 20mV. Por outro lado, na faixa entre 50 a 80 mV o pico sofre um alargamento e a barra de erro fica maior (Figura 23B) à medida que aumenta a amplitude.

A Figura 23B mostra como a amplitude do pulso afeta a corrente de pico (I_p) e a largura à meia altura do pico ($W_{1/2}$). Nota-se que a corrente de pico cresce consideravelmente com o aumento da amplitude até cerca de 30 mV, apresentando uma leve diminuição em amplitudes superiores. As barras de erros relacionados com a corrente de pico não são constantes, exibindo variações irregulares.

Quanto à largura do pico, observa-se uma diminuição até 60 mV, indicando a formação de picos mais finos e definidos. No entanto, acima desse valor, $W_{1/2}$ começa a crescer novamente, indicando uma diminuição no sinal voltamétrico.

Figura 23. (A) Resposta voltamétrica do estudo da amplitude para as moléculas de iso- α -ácidos em 2,5 mg L⁻¹. (B) Gráfico do pico de corrente (I_p) *versus* modulação de amplitude *versus* largura à meia altura do pico ($W_{1/2}$). Parâmetros: Incremento de potencial: 6 mV e frequência: 20 s⁻¹



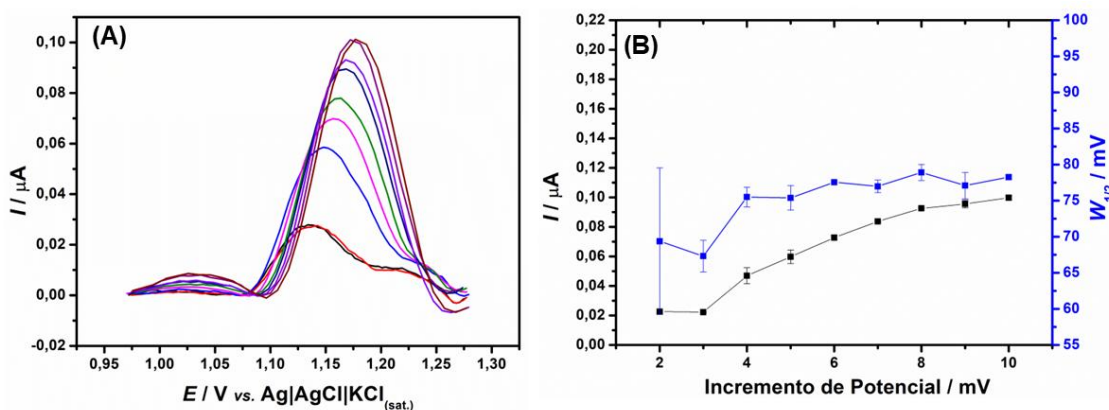
Fonte: A autora.

Segundo De Souza (2003), afirma que em processos irreversíveis a amplitude pode melhorar a sensibilidade do sinal, visto que a variação no meio da solução, contribui para a resposta de corrente, contudo para as amplitudes muito elevadas podem afetar a definição do pico (De Souza; Machado; Avaca, 2003). Sendo assim, diante dos resultados obtidos, a amplitude escolhida foi de 30mV, com o perfil de iso- α -ácidos mais definido e com um menor erro entre a aplicação de pulsos de potenciais e a largura de meia altura.

5.4.5.2 Incremento de Varredura de Potencial (Incremento de Potencial)

O incremento de varredura de potencial (ΔE_s) é definido com a distância entre dois pontos consecutivos durante a varredura voltamétrica. O incremento de varredura expressa a quantidade de pontos do equipamento em relação ao eixo do potencial. No caso de processos irreversíveis o aumento do incremento de varredura pode aumentar a corrente de pico, melhorando a sensibilidade no processo (De Souza; Machado; Avaca, 2003). Os voltamogramas do incremento de varredura de potencial, exibido pela Figura 24, foi analisado nos intervalos de 2 a 10 mV.

Figura 24. (A) Resposta voltamétrica do estudo de incremento de potencial para as moléculas de iso- α -ácidos em 2,5 mg L⁻¹. (B) Gráfico do pico de corrente (I_p) *versus* incremento de potencial *versus* largura à meia altura do pico ($W_{1/2}$). Parâmetros: Amplitude: 30 mV; 6 mV e frequência 20 s⁻¹.



Fonte: A autora.

A Figura 24A mostra que os menores aumentos de potencial resultaram em picos de oxidação dos iso- α -ácidos de baixa intensidade e com perfil pouco definido em comparação com os outros valores analisados. Porém, incrementos de potencial iguais ou superiores a 4 mV resultaram em picos mais definidos e com maior corrente de pico, indicando uma melhoria no sinal voltamétrico.

Analisando a Figura 24B mostra que o ponto de 6 mV apresenta baixa variabilidade experimental, pois as barras de erro são quase desprezíveis em relação aos valores de corrente de pico e largura à meia altura. Esse valor foi utilizado nas análises subsequentes, levando em consideração a o perfil do pico e a reprodutibilidade das medidas.

5.4.5.3 Frequência: modulação do pulso

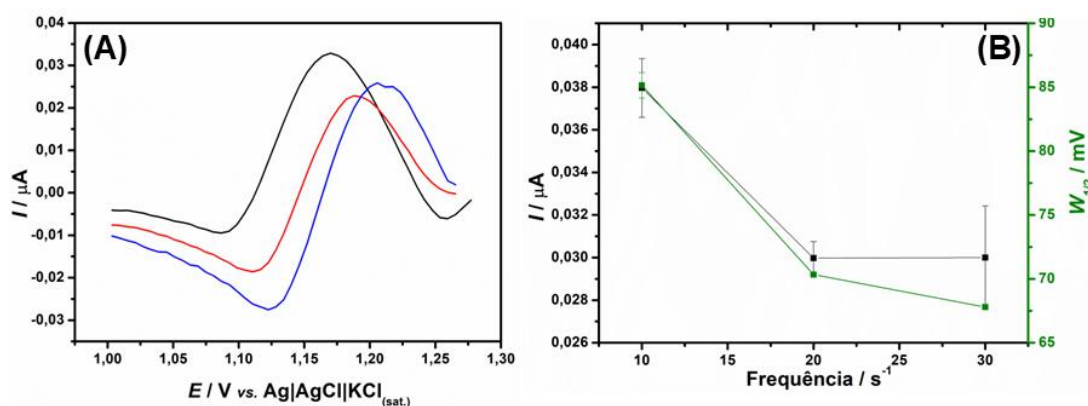
A frequência é um parâmetro utilizado em VOQ para controlar o tempo de pulsos que é aplicado ao sistema eletroquímico. A partir da Equação 5 é possível prever o tempo que leva para uma reação ocorrer no meio da solução, entre o analito e a superfície de eletrodo (Mirceski; Skrzypek; Stojanov, 2018).

$$f = \frac{1}{2t_p} \quad \text{Equação 5}$$

Na equação, f é a frequência e t_p é o tempo de cada pulso, portanto, se a frequência aumenta, o tempo de cada pulso diminui e, quanto menor a frequência, maior o tempo de cada pulso. Assim, dependendo do tipo de reação de oxidação ou redução, as moléculas precisam de um determinado tempo para entrar em equilíbrio na interface eletrodo e solução (Mirceski; Skrzypek; Stojanov, 2018).

No experimento, a frequência de modulação dos pulsos foi avaliada na faixa de 10 a 30 s^{-1} , como mostrado na Figura 25. Não foi possível avaliar frequências superiores devido ao aumento do ruído de fundo observado durante as análises.

Figura 25. (A) Resposta voltamétrica do estudo de incremento de potencial para as moléculas de iso- α -ácidos em 2,5 $mg\ L^{-1}$. (B) Gráfico do pico de corrente (I_p) *versus* incremento de potencial *versus* largura à meia altura do pico ($W_{1/2}$). Parâmetros: Incremento de potencial: 6 mV e Amplitude: 20mV.



Fonte: A autora.

A frequência de 10 s^{-1} foi selecionada com base nos resultados apresentados na Figura 25A e 25B, por proporcionar maior intensidade de corrente, um sinal de pico mais definido. Além disso, a menor frequência implica um maior tempo de pulso, permitindo que a reação de oxidação dos iso- α -ácidos ocorra durante um período mais longo de interação com a superfície do eletrodo.

Através dos resultados obtidos por VOQ, o estudo de otimização, construiu-se a Tabela 3 com os valores selecionados de cada parâmetro avaliado pelo método univariado. A escolha foi realizada com base no perfil eletroquímico dos iso- α -ácidos, priorizando maior intensidade

de corrente, melhor definição do pico e menor alargamento de pico, além de considerar os desvios experimentais associados à corrente e à largura à meia altura do pico.

Tabela 3. Otimização dos parâmetros experimentais na técnica VOQ para a mistura dos iso- α -ácidos.

Parâmetros	Faixa de estudo	Valores selecionados
Amplitude / mV	10 - 80	30
Incremento de Potencial/ mV	2 - 10	6
Frequência / s ⁻¹	10-30	10

Fonte: A autora.

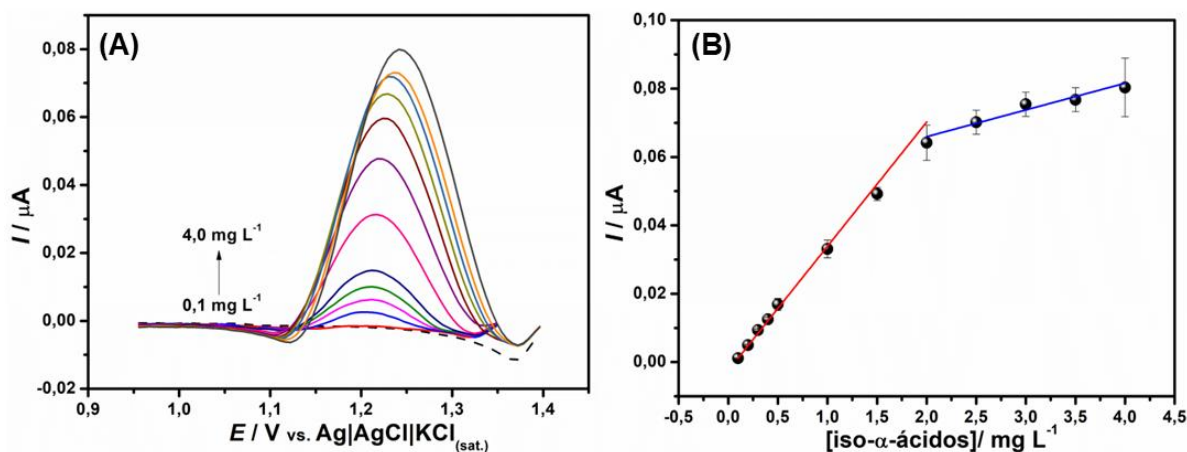
5.5 Parâmetros voltamétrico do método analítico

Os parâmetros voltamétricos empregados neste estudo se baseiam na metodologia desenvolvida e otimizada (Tabela 3). Logo, os parâmetros utilizados são: eletrólito de suporte como solução tampão de Britton Robinson; pH 2 da solução, amplitude de 30 mV, incremento de potencial de 6 mV e frequência de 10 s⁻¹. A fim de analisar o desempenho analítico dos iso- α -ácidos, outros parâmetros foram averiguados, tais como o limite de detecção e quantificação, linearidade, seletividade e entre outros, com base na curva analítica.

5.5.1 Curva Analítica

A construção da curva analítica mostrada na Figura 26, pela técnica VOQ, foi obtida através do método da adição de padrão múltiplas (Skoog *et al.*, 2006) da solução de iso- α -ácidos 0,5 mg L⁻¹, utilizando uma célula eletroquímica de impressão 3D, com solução de eletrólito de suporte BR pH 2, empregando eletrodo de folha de grafite.

Figura 26.(A) Respostas voltamétricas da curva analítica de iso- α -ácidos em 0,1 – 4,0 mg L⁻¹, adicionadas sucessivamente nas condições otimizadas. (B) Calibração da curva analítica. Parâmetros: amplitude: 30 mV; incremento de potencial: 6 mV; frequência: 10 s⁻¹



Fonte: A autora.

Através da construção da curva analítica foi possível obter alguns dados como limite de detecção, limite de quantificação, linearidade e coeficiente de determinação. Ao observar a Figura 26A, nota-se que inicialmente o perfil de iso- α -ácidos tem um comportamento linear, ou seja, observa-se um aumento da corrente de pico com o aumento da concentração. Porém, o aumento da concentração de iso- α -ácidos resulta tanto no deslocamento do potencial de pico para valores mais positivos como também no alargamento do pico. O estudo apresentou duas faixas lineares, sendo a primeira entre 0,1 – 1,5 mg L⁻¹.

A presença de duas faixas lineares pode ser justificada através da adsorção do analito na superfície do eletrodo de folha de grafite. Esse comportamento pode ser comparado ao perfil de curva de isoterma, no qual coincide com o gráfico I_p versus concentração. Segundo Giles e colaboradores (1960), esse tipo de comportamento ocorre quando a adsorção do analito na superfície do substrato se aproxima da saturação, resultando na formação de uma região de platô na curva. Consequentemente, observa-se uma mudança abrupta na faixa linear inicialmente estabelecida, refletindo a limitação progressiva dos sítios de adsorção disponíveis na superfície do eletrodo.

Algumas condições podem favorecer esse efeito como: o substrato (eletrodo) com superfície porosa; analito que possui maior afinidade pelo substrato do que o solvente e penetração do analito no substrato em função a geometria molecular e das regiões cristalinas

do substrato (Giles *et al.*, 1960). O estudo realizado por Silva e colaboradores (2019) caracterizou a superfície dos eletrodos de folhas de grafites através da microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia Raman, sendo constatado que há defeitos na estrutura, sendo associados a vacância. O estudo realizado corrobora para a hipótese de que as duas faixas lineares podem ser devido a deformações na superfície do eletrodo.

O Limite de Detecção (LD) é definido como a menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada de maneira confiável (Araujo, 2009). A quantidade mínima do analito a ser detectado em um experimento deve ser distinguível do sinal de ruído durante a realização de um experimento, para garantir a confiabilidade do método. Dessa forma, é importante salientar que o valor mínimo do analito deve ser superior ao sinal do branco ou ruído, para que seja detectado com confiança (INMETRO, 2020). Pela Equação 6, o LD foi calculado a partir dos parâmetros obtidos pela curva analítica (Gustavo González; Ángeles Herrador, 2007)

$$LD = \frac{3 \times \sigma b}{S} \quad \text{Equação 6}$$

Sendo σb o desvio padrão relativo ao intercepto relacionado a curva, S é o coeficiente angular da curva analítica. O valor LD obtido na primeira faixa linear foi de 0,008 mg L⁻¹. Dessa forma, o baixo valor observado indica que a metodologia apresenta uma sensibilidade aceitável para a detecção de iso- α -ácidos em baixas concentrações nas condições experimentais avaliadas.

O limite de quantificação (LQ) é definido como a menor concentração da espécie analítica que pode ser determinada quantitativamente pelo método analítico o método pode medir de forma confiável. Nessa concentração, o analito deve ser medido com um grau de precisão e exatidão aceitável. Dessa forma, o LQ indica a menor concentração em que o método ainda consegue produzir resultados quantitativos confiáveis. Através da Equação 7, o LQ foi calculado a partir dos parâmetros obtidos pela curva analítica (Gustavo González; Ángeles Herrador, 2007)

$$LQ = \frac{10 \times \sigma b}{S} \quad \text{Equação 7}$$

Dessa forma, σb é o desvio padrão relativo ao intercepto relacionado a curva, S é o coeficiente angular da curva analítica. Para o LQ, o valor descrito pela primeira faixa linear foi de 0,027 mg L⁻¹. Desse modo, A Tabela 4, apresenta os dados obtidos a partir da curva analítica para a primeira faixa linear, o método desenvolvido possibilita a determinação adequada para a

quantificação de iso- α -ácidos em níveis baixos de concentrações, apresentando um desempenho analítico satisfatório.

Tabela 4. Parâmetros da curva analítica na voltametria de onda quadrada da análise de iso- α -ácidos.

Parâmetros analíticos	faixa linear
Faixa linear/ mg L ⁻¹	0,1 – 1,5
R ²	0,9975
Sensibilidade/ μ A L mg ⁻¹	0,0363 $\pm$ 0,0010
Coeficiente linear/ μ A	0,0025 $\pm$ 0,0001
Equação da reta	$I = 0,0363[\text{iso-}\alpha\text{-ácidos}] - 0,0025$
LD/ mg L ⁻¹	0,008
LQ/ mg L ⁻¹	0,027

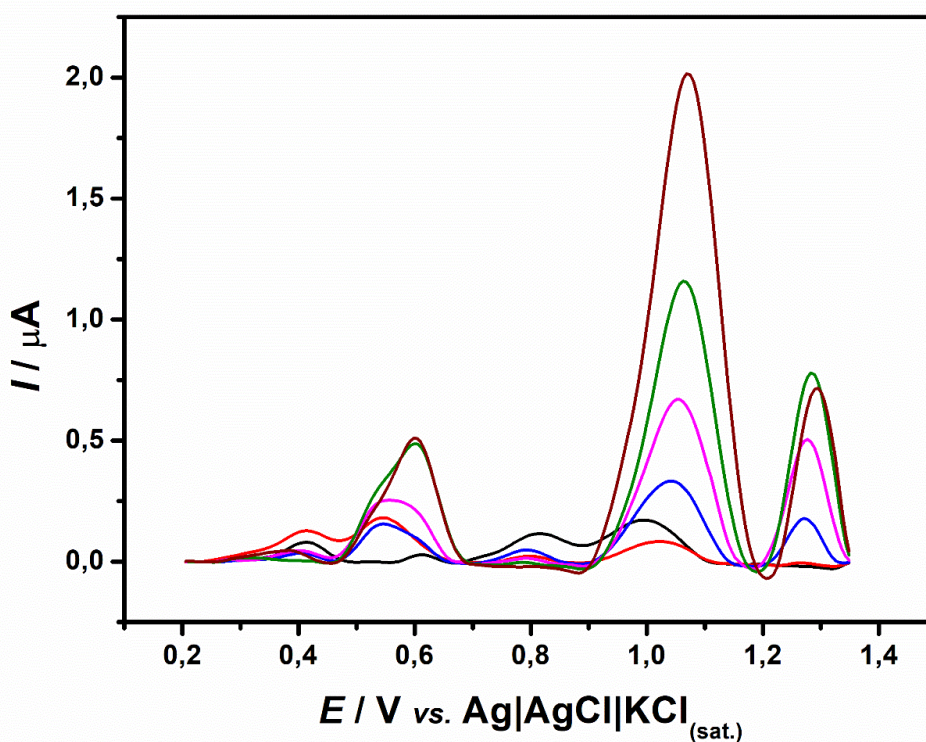
Fonte: A autora.

5.6 Determinação de iso- α -ácidos em amostras de cervejas no método eletroanalítico e no método espectrofotométrico.

5.6.1 Resposta voltamétrica de amostra de cerveja diluída

Primeiramente, para as análises de iso- α -ácidos ligadas ao amargor da cerveja, este estudo sugere a quantificação da bebida, sem qualquer tratamento prévio. Com o objetivo de medir diretamente o amargor dos iso- α -ácidos, empregando a técnica VOQ desenvolvida, utilizando a diluição simples da cerveja. A Figura 27 mostra a resposta voltamétrica da amostra de cerveja BS1 diluída em 1:10 até 1:1000 (v/v) no eletrólito de suporte tampão BR 2.

Figura 27. Estudo da resposta voltamétrica da diluição da cerveja (BS1), com a varredura de potencial de +0,2V até +1,4V. Diluições: 10 vezes (linha marrom); 25 vezes (linha verde); 50 vezes (linha rosa); 100 vezes (linha azul); 500 vezes (linha vermelha) e 1000 vezes (linha preta). Parâmetros: amplitude: 30 mV; incremento de potencial: 6 mV; frequência: 10 s⁻¹.



Fonte: A autora.

Ao analisar o perfil voltamétrico da cerveja (BS1) diluída em diversas concentrações, observa-se que as intensidades das correntes não variam proporcionalmente com a diluição, um aspecto ligado à complexidade da matriz. Além do pico característico dos iso- α -ácidos, a amostra de cerveja apresentou outros compostos eletroativos; no entanto, esses compostos não afetam o potencial dos iso- α -ácidos.

O ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) regula os ingredientes que compõem a cerveja (BRASIL, 2019) sendo permitido, a adição de alguns conservantes ao produto. No entanto a presença desses componentes pode interferir nas análises voltamétricas, resultando em alterações na corrente e no potencial característico dos iso- α -ácidos.

Segundo INMETRO (2020), a matriz de amostra pode conter elementos que afetam a precisão da medição, assim esses interferentes podem aumentar ou diminuir o sinal, afetando o resultado. No presente estudo, quando a amostra foi analisada, observou-se uma corrente de pico maior em comparação com a obtida para a curva analítica de iso- α -ácidos, sugerindo uma influência adicional do meio na interface analito-eletrodo. Com isso, optou-se por investigar

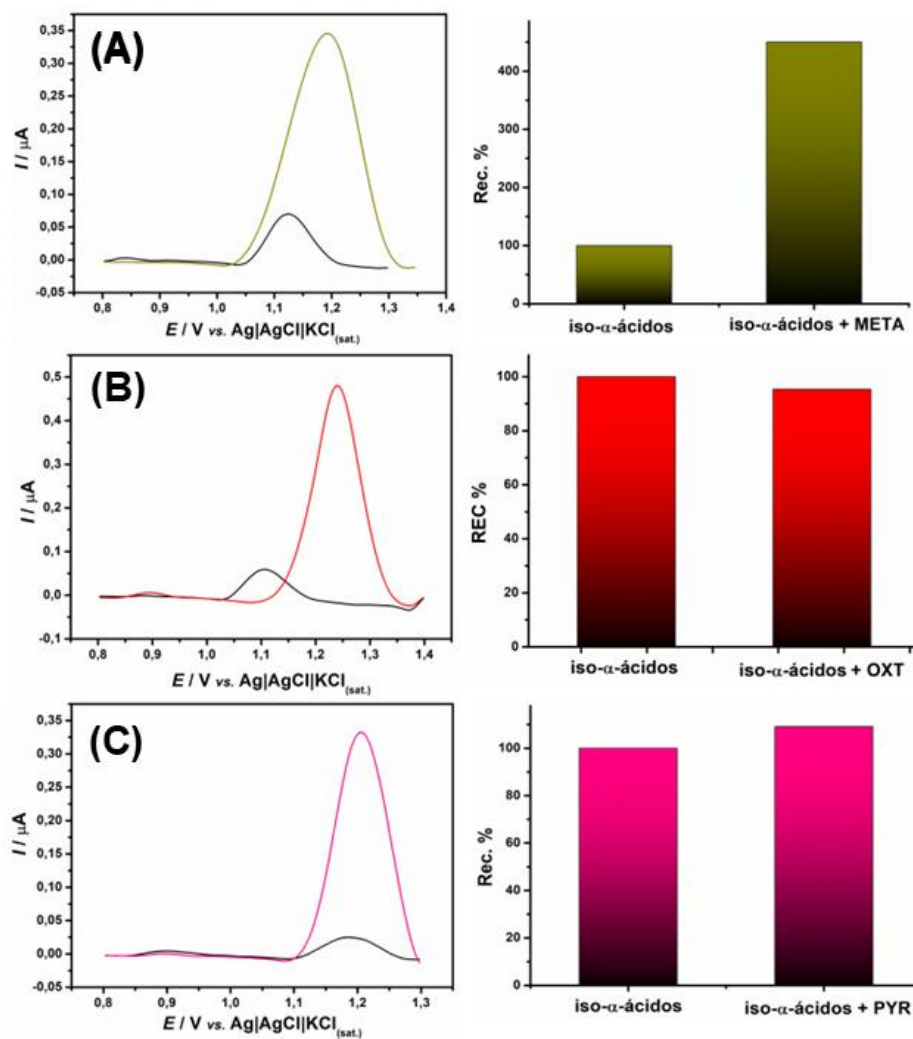
quais os componentes presentes na cerveja que poderiam vir a interferir na determinação do amargo da cerveja.

5.6.2 Estudo de Interferentes

A análise realizada com o eletrodo de folha de grafite mostrou que o método necessita de alguns ajustes para a quantificação de iso- α -ácidos presente em matriz complexa. O desafio na química analítica é transpor essa barreira, quando se trata de análise em uma amostra com vários componentes, pois a concentração do analito de interesse pode estar em níveis baixos, e as concentrações de outros analitos podem afetar o seu sinal (Persson; Vessman, 2001).

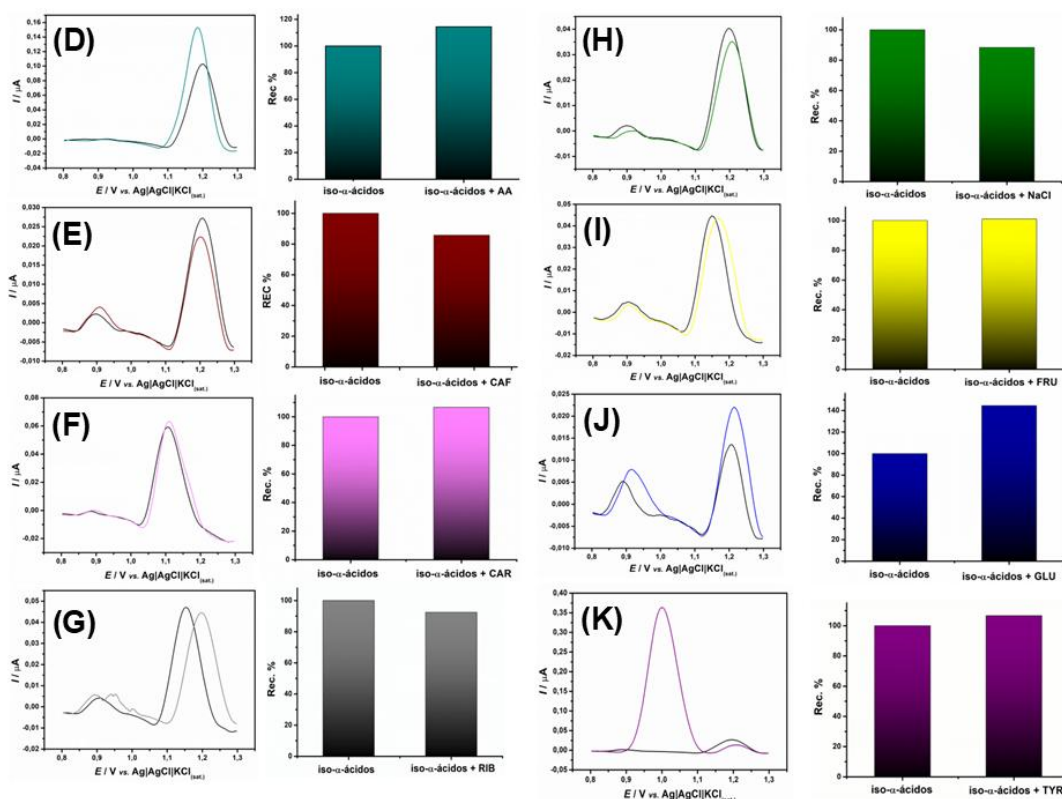
Com base na literatura realizou-se o estudo de interferentes que poderiam estar presentes na composição química da cerveja (Brasil, 2011; Cortacero-Ramírez *et al.*, 2003). Foram avaliados onze possíveis interferentes, utilizando os parâmetros otimizados para os iso- α -ácidos, a Figura 28 apresenta os interferentes que podem estar presentes na cerveja e que influenciaram no pico do potencial e corrente, característico dos iso- α -ácidos, na Figura 29 estão representados os interferentes que não influenciaram no pico de oxidação característico dos iso- α -ácidos. Os interferentes incluem ácido ascórbico (AA), cloreto de sódio (NaCl), cafeína (CAF), frutose (FRU), carbonato de sódio (CAR), glicose (GLU), riboflavina (RIB), tirosina (TYR), metabissulfito de sódio (META), oxalato de sódio (OXT) e piridoxina (PYR).

Figura 28. Respostas voltamétricas das alterações na corrente de pico para os iso- α -ácidos ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) em tampão BR2, após a adição de interferentes ($1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$): (A) MET: amarelo escuro; (B) OXT: vermelho; (C) PYR: rosa. Gráfico ao lado correspondente a recuperação dos interferentes em relação aos iso- α -ácidos. Parâmetros: amplitude: 30 mV ; incremento de potencial: 6 mV ; frequência: 10 s^{-1} . As linhas pretas representam as respostas antes da adição.



Fonte: A autora.

Figura 29. Respostas voltamétricas das alterações na corrente de pico para os iso- α -ácidos ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$) em tampão BR2, após a adição de diferentes interferentes ($1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Interferentes: (D) AA –ciano; (E) CAF –vinho; (F) CAR –magenta; (G) RIB –cinza; (H) NaCl –verde; (I) FRU –amarelo; (J) GLU –azul; (K) TYR –roxo. Gráfico ao lado correspondente a recuperação dos interferentes em relação aos iso- α -ácidos. Parâmetros: amplitude: 30 mV ; incremento de potencial: 6 mV ; frequência: 10 s^{-1} . As **linhas pretas** representam as respostas antes da adição.



Fonte: A autora.

As análises voltamétricas revelaram que apenas três desses compostos exibiram respostas eletroquímicas que se sobrepõem à região de potencial característica dos iso- α -ácidos (metabissulfito de sódio, oxalato de sódio e piridoxina), conforme a Figura 28, comumente empregados como aditivos em formulações de cerveja (Brasil, 2011). A Figura 29 mostra os outros interferentes avaliados que não apresentaram sinal na região do potencial característico dos iso- α -ácidos.

5.6.3 Método espectrofotométrico na determinação do amargor em cerveja

A determinação do amargor da cerveja é expressa em IBU, e a análise é realizada pela técnica espectrofotométrica, sendo uma metodologia comumente empregada para determinação de IBU e um procedimento padronizado de acordo com a EBC, este método envolve a extração dos iso- α -ácidos com isooctano em condições ácidas, (EBC, 2020; Coelho-Neto *et al.*, 2022).

Após analisar a amostra de cerveja diluída pela técnica espectrofotométrica, decidiu-se por utilizar essa metodologia no estudo. A pesquisa realizada por Hunter e Dompkowski (2018) destacou a importância de determinar o IBU utilizando amostras adequadamente tratadas, em um meio de extração apropriado. Com o objetivo de promover a migração de iso- α -ácidos para a fase orgânica de isooctano, melhorando a eficácia do método e reduzindo a presença de outros interferentes.

A investigação de interferentes revelou que três possíveis aditivos poderiam ter a mesma região de potencial dos iso- α -ácidos, resultando na sobreposição de potencial. Além disso, observou que esses aditivos exibem absorvância em regiões espectrais próximas àquela empregada para quantificação de iso- α -ácidos.

Um exemplo é o metabissulfito de sódio, que apresenta absorvância máxima em 277 nm, em solução de BR 2, (Junior *et al.*, 2010). Isso sugere que um dos interferentes poderia estar na mesma região do potencial de iso- α -ácidos. Outro estudo revelou um comportamento diferente do metabissulfito de sódio em determinadas soluções: quando dissolvido em água, sua absorvância é de 257 nm, no entanto, na presença de ácido clorídrico a sua absorvância passa a ser de 276 nm (Yang *et al.*, 2013).

Estima-se que aproximadamente 70% da absorvância total medida corresponda efetivamente aos iso- α -ácidos na análise do amargor em cerveja por método espectrofotométrico, resultando em uma superestimação desse valor (Buckee, 1990). Esse efeito seria ainda mais pronunciado no caso de medições diretas na cerveja, uma vez que interferentes, como o metabissulfito de sódio, são mais favoráveis a solubilidade na matriz aquosa da cerveja, do que na fase orgânica do isooctano, contribuindo para absorvância adicional na mesma região espectral dos iso- α -ácidos (Guido, 2016).

Na metodologia utilizada no trabalho de Coelho-Neto *e colaboradores* (2022) foi adicionada uma etapa a fim de minimizar a interferência durante a extração com isooctano. O sulfato de magnésio anidro foi adicionado para remover a umidade residual, visto que os interferentes são altamente solúveis em água. Essa abordagem mostrou-se eficaz quando aplicada à técnica espectrofotométrica e voltamétrica para determinação dos iso- α -ácidos. A

Tabela 5 apresenta os valores obtidos pela técnica espectrofotométrica, com absorbância em 275 nm, que é a região característica de absorbância de iso- α -ácidos (Coelho Neto *et al.*, 2020).

Tabela 5. Comparação dos valores de IBU das amostras de cervejas na técnica espectrofotométrica com absorbância em 275nm, entre os valores declarados pelos fabricantes e obtidos pelo método.

Amostras de cervejas	Valor de IBU declarado pelo fabricante	Valor de IBU pela técnica espectrofotométrica	Erro relativo (%)
BS1	46	$58,8 \pm 0,7$	+ 27,83
BS2	40	$36,2 \pm 4,1$	- 9,5
BS3	18	$13,3 \pm 0,1$	- 26,11

Fonte: A autora.

A técnica espectrofotométrica exibiu valores de absorbância diferentes em relação ao valor fornecido pelo fabricante. O valor de IBU foi determinado utilizando a Equação 1. As discrepâncias observadas sugerem que essa metodologia pode estar sujeita a interferências e erros analíticos, comprometendo a exatidão dos resultados obtidos.

5.6.4 Avaliação do IBU de amostra de cerveja em etapa anterior a adição de lúpulo nos métodos eletroanalítico e espectroscópico

Uma amostra (BS4) coletada durante a brassagem foi analisada para verificar a possível influência dos componentes do mosto na resposta espectrofotométrica a 275 nm, comprimento de onda utilizado para a determinar o amargor relacionado aos iso- α -ácidos. Dessa maneira, considerando que alguns compostos presentes na matriz cervejeira podem apresentar absorção nessa região, essa análise permitiu avaliar possíveis interferências no sinal analítico. O valor de absorbância está apresentado na Tabela 6, bem como o IBU calculado.

Tabela 6. Valor de absorbância da amostra BS4 no comprimento de onda de 275 nm e IBU.

Amostra	Absorbância	IBU
BS4	$0,1135 \pm 0,0005$	$5,7 \pm 0,1$

Fonte: A autora.

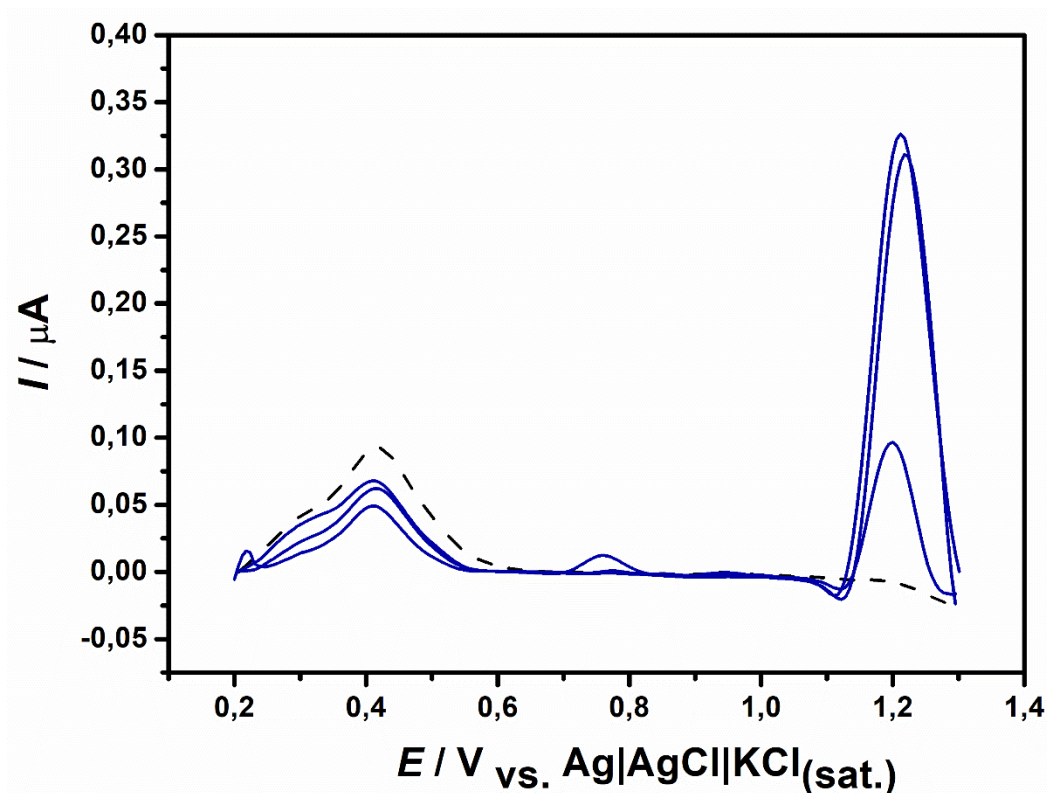
Os resultados apresentados na Tabela 6 sugerem a presença de outros compostos capazes de absorver radiação na região de 275 nm, mesmo antes da adição do lúpulo. Esse comportamento indica que essas espécies podem contribuir para a absorbância medida e, conseqüentemente, superestimar os valores de IBU obtidos pelo método espectrofotométrico. Assim, os resultados evidenciam a possibilidade de interferências da matriz na determinação do amargor da cerveja.

Esses resultados reforçam a hipótese de que a matriz da cerveja contém espécies interferentes capazes de absorver próximo da região em 275 nm, comprometendo a seletividade do método espectrofotométrico.

A amostra BS4, também foi analisada pelo método eletroanalítico desenvolvido para comparar seu valor de IBU, com o valor declarado pelo fabricante. No método espectrofotométrico, essa amostra exibiu uma absorbância a 275 nm, o que comprometeu o valor de IBU, evidenciando que essa técnica não é seletiva para os iso- α -ácidos após o pré-tratamento da amostra.

Obteve 4,5 mg de extrato isoctano de BS4, diluída 140 vezes para a resposta voltamétrica na técnica VOQ, a fim de analisar se teria o mesmo comportamento obtido na técnica de espectrofotometria. Realizou a análise com o eletrodo de folha de grafite, eletrólito de suporte tampão BR 2, como mostra Figura 30.

Figura 30. Voltamogramas de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ da amostra BS4 em branco, representada pela linha tracejada, com adição sucessiva da fração iso- α -ácidos em $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (linha-azul). Parâmetros: amplitude: 30 mV ; incremento de potencial: 6 mV ; frequência: 10 s^{-1} .



Fonte: A autora.

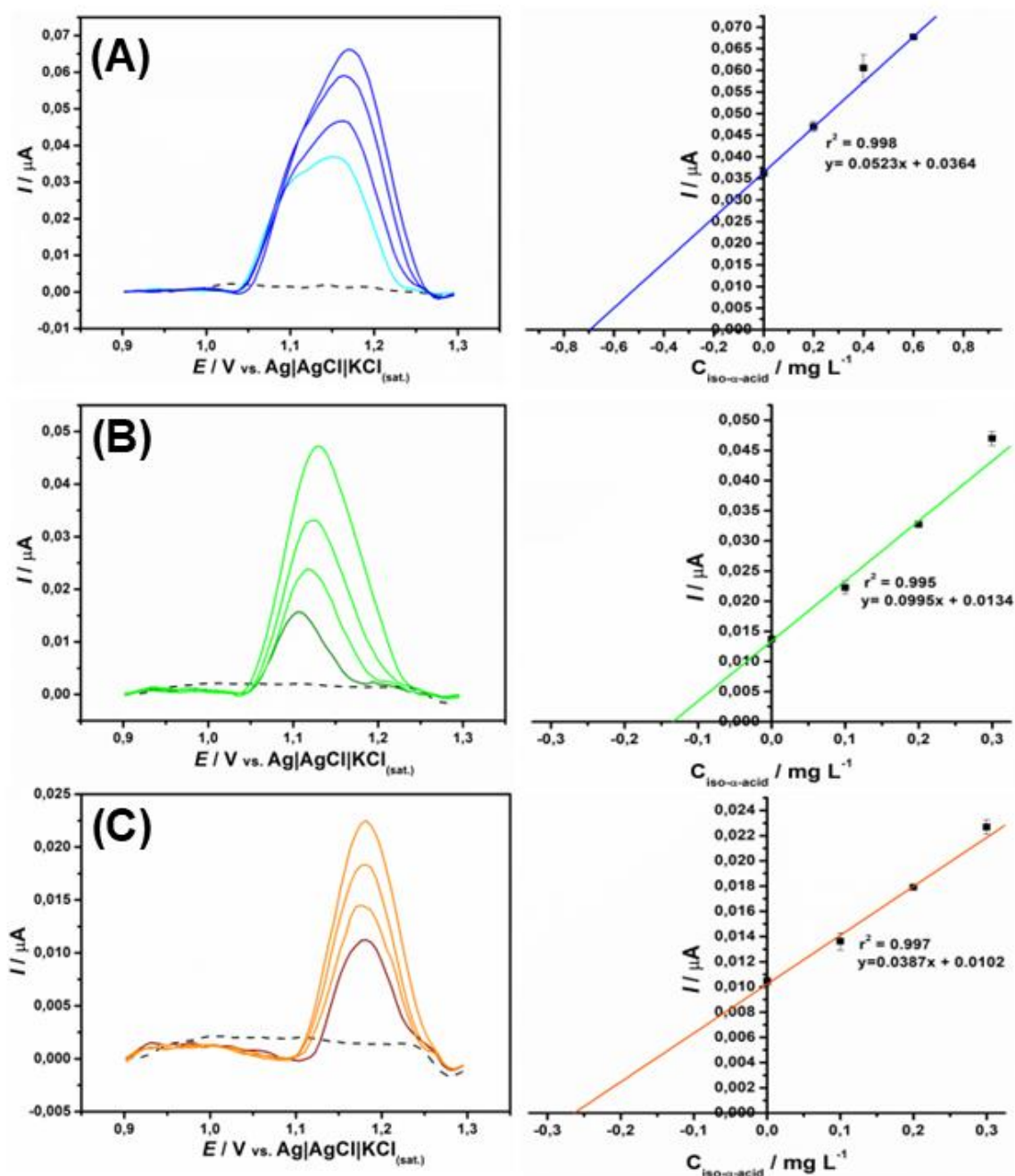
A Figura 30 indica que a amostra BS4 ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$) não apresenta o pico característico dos iso- α -ácidos. A análise que contém a amostra BS4 confirma a ausência de iso- α -ácidos, utilizando o método de adição de padrão múltiplos com $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de iso- α -ácidos. Assim, a técnica voltamétrica demonstrou maior seletividade em amostras de cerveja, mesmo depois da extração com isooctano e o pré-tratamento.

5.6.5 Método eletroanalítico na determinação de iso- α -ácidos em amostras de cervejas

Pelas análises anteriores, como a curva analítica e seus parâmetros, e o estudo em relação ao efeito de matriz, optou por realizar o pré-tratamento e extração com isooctano para realizar a quantificação iso- α -ácidos presentes nas amostras de cervejas. A massa obtida para cada extrato foi de $7,0 \text{ mg}$ para amostra BS1, $12,2 \text{ mg}$ para a amostra BS2 e $7,1 \text{ mg}$ para a amostra BS3.

Com isso, os extratos BS1 e BS3 foram diluídos 70 vezes, enquanto o BS2 necessitou de uma diluição de 350 vezes. A quantificação foi realizada pelo método de adição de padrão com soluções de extrato de cerveja: 0,1 mg L⁻¹ para BS1 e BS3, e 0,2 mg L⁻¹ para BS2. A Figura 31 apresenta os voltamogramas de onda quadrada e as respectivas curvas de calibração para cada amostra. A Tabela 7 apresenta os valores de IBU obtidos pelos métodos espectrofotométrico e eletroquímico, e os erros relativos calculados, considerando os valores fornecidos pelo fabricante como os valores reais.

Figura 31. Voltamogramas corrigidos pela linha de base para extratos de cerveja BS1 (70×), BS2 (350×) e BS3 (70×). Linha tracejada em preto sendo o branco. BS1 (A): inicialmente sem iso- α -ácidos linha azul-claro, e após adições sucessivas de 0,20 mg L⁻¹ de iso- α -ácidos linhas em azuis-escuros. BS2 (B): inicialmente sem iso- α -ácidos linha verde-escuro, e após adições sucessivas de 0,10 mg L⁻¹ de iso- α -ácidos linhas em verdes-claros. BS3 (C): inicialmente sem iso- α -ácidos linha vinho, e após adições sucessivas de 0,20 mg L⁻¹ de iso- α -ácidos linhas laranjas. O gráfico ao lado representa a curva de calibração para a recuperação de iso- α -ácidos, nos extratos de cervejas. Curvas de calibração correspondentes obtidas pelo método de adição padrão. Parâmetros: tampão BR2,0, amplitude: 30 mV; incremento de potencial: 6 mV; frequência: 10 s⁻¹.



Fonte: A autora.

Tabela 7. Resultados de IBU (mg L^{-1}) para três amostras de cerveja analisadas pelo método eletroquímico (eletrodo folha de grafite) e espectrofotometria (275 nm).

Amostras	Declarado pelo fabricante	Método Eletroquímico		Método espectrofotométrico	
	IBU / mg L^{-1}	IBU / mg L^{-1}	Erro relativo / %	IBU / mg L^{-1}	Erro relativo / %
BS1	46	$48,1 \pm 0,8$	+ 4,6	$58,8 \pm 0,7$	+ 27,8
BS2	40	$41,6 \pm 4,0$	+4,0	$36,2 \pm 4,1$	- 9,5
BS3	18	$17,6 \pm 1,0$	- 2,2	$13,3 \pm 0,1$	- 26,1

Fonte: A autora.

Os valores de erro relativo variaram consideravelmente entre os diferentes níveis de IBU avaliados. Quando comparados com os valores de IBU informados nas embalagens, os valores de erro relativo obtidos pelo método eletroquímico ficaram dentro de uma faixa aceitável ($< 5\%$), resultado não observado para o método espectrofotométrico. As medições eletroquímicas foram baseadas no método de adição padrão, garantindo maior precisão e confiabilidade. Em contrapartida, o método espectrofotométrico se baseia em uma abordagem simplificada descrita na Equação 1, embora teoricamente correta, não considera possíveis erros de concentração ou interferências de outros compostos.

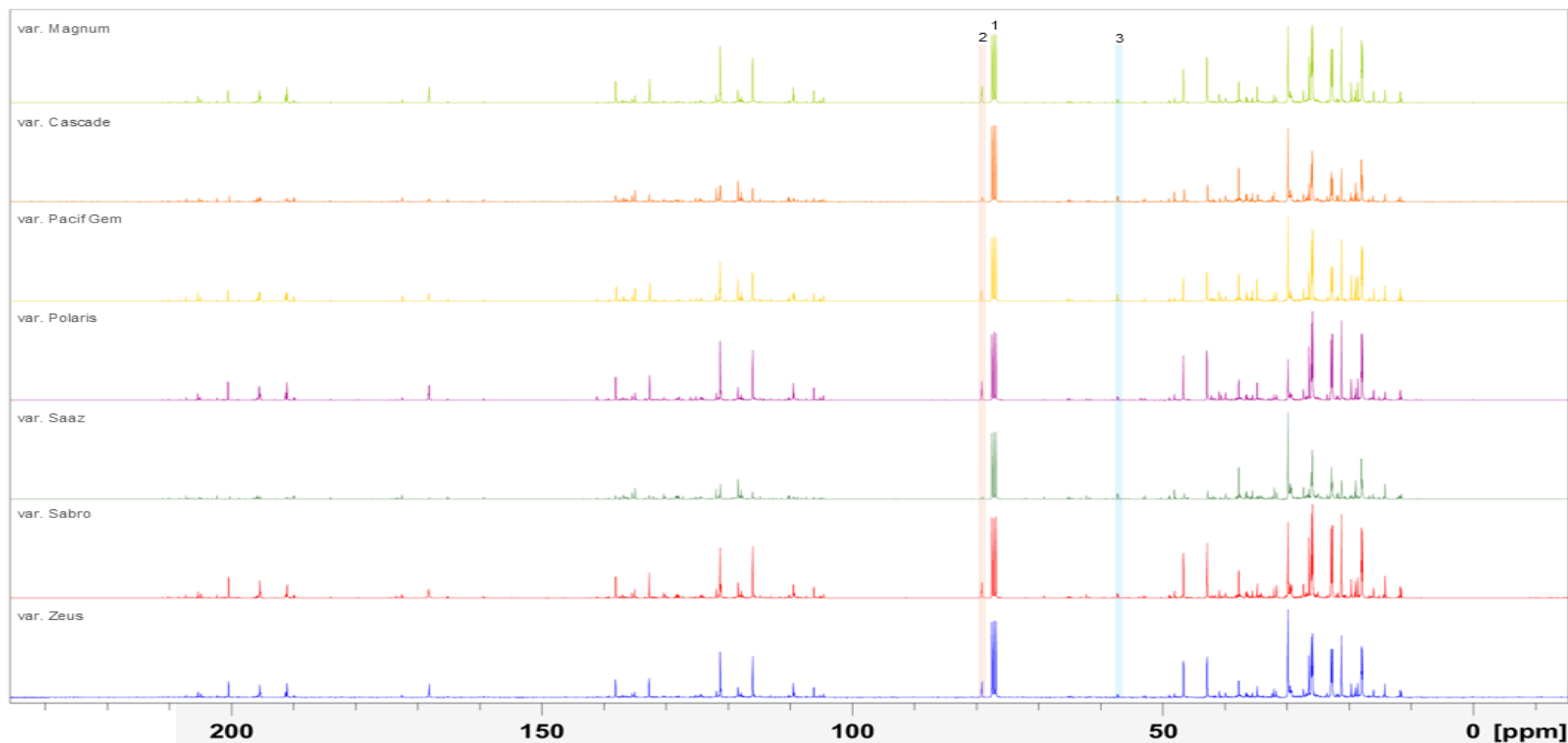
5.7 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear

A técnica espectroscópica de RMN- ^{13}C pode ser utilizada para caracterizar, identificar e comparar amostras de diferentes tipos, uma das suas vantagens é ser uma técnica não destrutiva, sendo uma grande aliada na área de PNs para elucidação de compostos (Breton; Reynolds, 2013).

A análise comparativa dos extratos dos lúpulos foi conduzida utilizando a abordagem de *fingerprint* metabólico, empregando os espectros de RMN- ^{13}C como instrumento para avaliar o perfil químico total das amostras. Esse método possibilita a comparação de diversas amostras sem a obrigação de atribuir anotações nos sinais de individuais, tratando o conjunto de informações químicas no espectro como assinatura distinta de cada amostra. Portanto, as distribuições no deslocamento químico e intensidades relativas dos sinais observados foram analisadas, assim como as semelhanças e diferenças entre as variedades (Riswanto *et al.*, 2022). Para essa análise foram utilizados dados de referência encontrados na literatura.

Para a realização das análises, sete variedades comerciais de lúpulo (Cascade, Magnum, Pacif Gem, Polaris, Saaz, Sabro e Zeus) e seus respectivos extratos obtidos de acordo com o item 4.2. Os espectros obtidos de RMN- ^{13}C , como mostra a Figura 32, foram utilizados na análise de *fingerprint* metabólico, permitindo a comparação dos perfis químicos das diversas variedades com base na distribuição e intensidade relativa dos sinais.

Figura 32. Estudo *fingerprint* dos espectros de RMN- ^{13}C dos extratos obtidos a partir de variedades comerciais de lúpulo.



*1=pico de CDCl_3 , 2 = região de α -ácidos e 3 = região de β -ácidos

Os espectros de RMN- ^{13}C dos extratos de lúpulo exibiram sinais característicos na região 79 ppm, atribuída na literatura a carbonos oxigenados (C-O) presentes nos α -ácidos do lúpulo. Nessa região as variedades Sabro, Magnum, Polaris e Zeus apresentaram sinas de intensidade semelhante, enquanto as variedades Cascade e Saaz, exibiram uma intensidade relativamente menor (Farag *et al.*, 2012). Comportamento semelhante foi observado na região de deslocamento químico entre 180 e 220 ppm, correspondente aos carbonos carbonílicos presentes nos extratos de lúpulos.

Os deslocamentos químicos associados aos β -ácidos, mostraram-se semelhantes para (Hoek; Hermans-Lokkerbol; Verpoorte, 2001; Silverstein; Webster; Kiemle, 2005) todas as variedades analisadas, sugerindo a presença do composto nos extratos de lúpulo (Haseleu; Intelmann; Hofmann, 2009). Na região entre 169-170 ppm, atribuída a carbonos aromáticos e oxigenados relacionados à ligação C-O presente no carbono C-5 dos α -ácidos, os extratos das variedades Cascade, Pacif Gem e Sazz não apresentaram sinais visivelmente definidos. Esse perfil pode indicar uma menor contribuição relativa dos α -ácidos nessas amostras, quando comparadas as outras variedades, sugerindo uma variação na composição químicas dos extratos de lúpulo (Silverstein; Webster; Kiemle, 2005).

A variedade Saaz apresentou o perfil químico bem distinto, entre as amostras analisadas, caracterizado pela ausência de sinais intensos na região entre 40 a 50 ppm, atribuída a carbonos alifáticos mais substituídos. Além disso, em comparação com as outras amostras, as variedades Saaz e Cascade mostraram uma intensidade relativamente menor dos sinais na faixa de deslocamento químico de 100 a 220 ppm. Essa região é associada a carbonos insaturados com duplas ligações, anéis aromáticos, carbonos aromáticos oxigenados e carbonilas (C=O), incluindo cetonas presentes nos α e β -ácidos do lúpulo (Hoek; Hermans-Lokkerbol; Verpoorte, 2001; Silverstein; Webster; Kiemle, 2005).

5.8 Caracterização dos lúpulos por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)

A amostra de extrato de lúpulo da variedade Sabro, e a fração de isolamento de α -ácidos, o produto resultante da isomerização (iso- α -ácidos) e as amostras de extratos de cervejas foram analisadas por CLAE-EM/EM, utilizando o modo negativo para a anotação dos compostos químicos. Essas amostras foram selecionadas para confirmar a presença dos compostos de interesse deste estudo, além de evidenciar sua importância para a caracterização química do lúpulo e sua utilização na indústria alimentícia

A Tabela 8 apresenta os principais compostos encontrados nas amostras analisadas. A identificação foi feita por meio da determinação da massa exata em alta resolução, cálculo do erro de massa em ppm, sugestão da fórmula molecular e comparação dos padrões de fragmentação obtidos por espectrometria de massas sequencial (EM/EM) com informações disponíveis na literatura. No Apêndice, são apresentados de maneira detalhada os cromatogramas, espectros de massas e espectros de fragmentação de cada amostra.

Tabela 8. Proposta de anotação dos principais compostos presentes nas amostras de (1) extrato de lúpulo, (2) α -ácidos isolados, (3) iso- α -ácidos, BS1, BS2 e BS3.

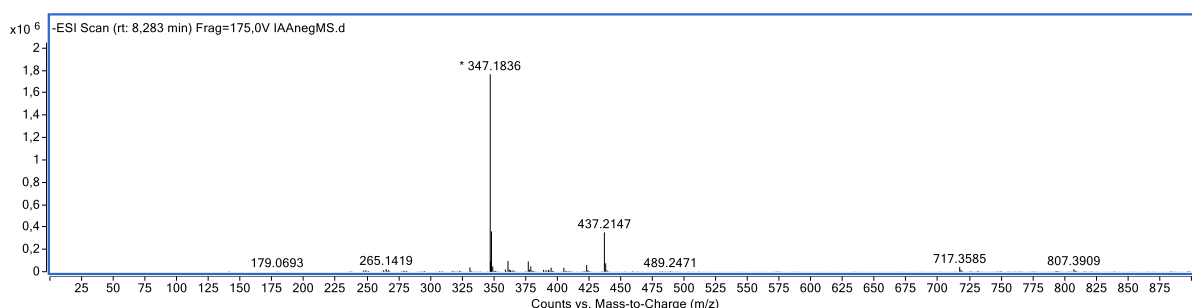
t_R (min)	Composto	[M – H] ⁻		Erro (ppm)	Íons Fragmentos (m/z) EM/EM	Amostras	Referência
		Íon precursor	m/z calculado				
10,947	Cohulupona	[C ₁₉ H ₂₅ O ₄] ⁻	317,1758	1,25	289, 261, 248, 233, 220, 205, 193, 180, 165, 152, 133, 111, 82	1,2,3 BS1 e BS2	(Hsu; Kao, 2019)
10,698	Humulona / Adhumulona	[C ₂₁ H ₂₉ O ₅] ⁻	361,2020	-0,55	343, 292, 249, 221, 179, 125	1 e 2	(Kontek <i>et al.</i> , 2021)
9,977	Cohumulona	[C ₂₀ H ₂₇ O ₅] ⁻	347,1864	-0,58	329, 278, 263, 235, 207, 165, 125,92	1 e 2	(Kontek <i>et al.</i> , 2021)
8,682	<i>cis</i> / <i>trans</i> - isohumulona <i>cis</i> / <i>trans</i> - isoadhumulona	[C ₂₁ H ₂₉ O ₅] ⁻	361,2020	-1,94	343, 317, 292, 265, 247, 235, 223, 196, 163, 125, 89, 99 61, 57	3, BS1, BS2 e BS3	(Intelmann; Haseleu; Hofmann, 2009)
8,449	<i>cis</i> / <i>trans</i> - isocohumulona	[C ₂₀ H ₂₇ O ₅] ⁻	347,1864	-0,86	329, 303, 301, 278, 251, 237, 233, 209, 207, 182, 181, 166, 163, 125, 111, 85	3, BS1, BS2 e BS3	(Intelmann; Haseleu; Hofmann, 2009)
8,267	Hulupona / Adhulupona	[C ₂₀ H ₂₇ O ₄] ⁻	331,1915	2,41	303, 262, 247, 234, 219, 194, 178, 166, 152, 125, 97, 82	1, 3, BS1 e BS2	(Ziemah; Ullrich; Kuhnert, 2024)

Fonte: A autora.

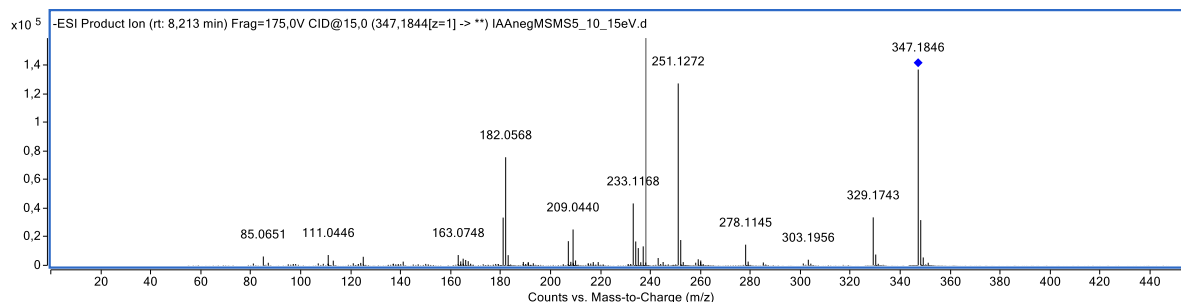
Os compostos do produto isomerizado de iso- α -ácidos foram selecionados para propor os processos de fragmentação da isocohumulona e da isohumulona/adhumulona. Inicialmente, os iso- α -ácidos foram analisados por CLAE-IES-EM/EM no modo negativo. No espectro de massas registrado, a molécula desprotonada com m/z 347,1864 foi anotada (Figura 33A). A Figura 33B ilustra o espectro de fragmentação da molécula desprotonada m/z 347 $[M - H]^-$, obtido com uma energia de colisão de 25 eV.

Figura 33. (-) ESI -EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 347,1836 do extrato de lúpulo var. Sabro.

(A)



(B)

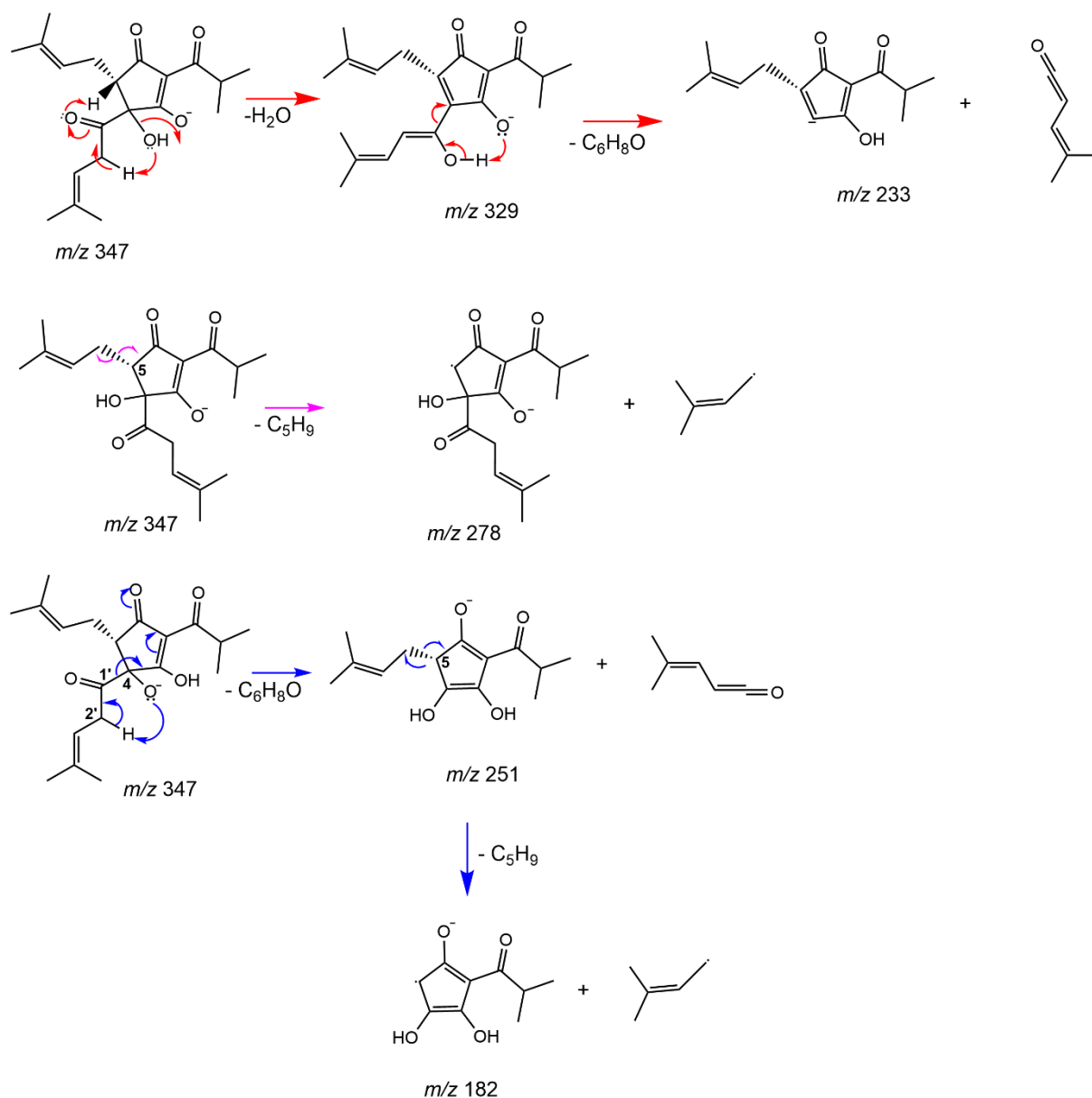


Fonte: A autora.

A isocohumulona apresentou a molécula desprotonada em m/z 347 $[M - H]^-$. A fragmentação desse íon resultou no fragmento m/z 329, o qual é atribuído à perda de uma molécula de água. A partir do fragmento m/z 329, ocorre um rearranjo de hidrogênio, levando à perda de um grupo C_6H_8O e à formação do fragmento m/z 233. Uma outra sugestão de mecanismo para a mesma molécula desprotonada m/z 347 $[M - H]^-$, envolve uma ruptura homolítica no C-5, resultando na perda do grupo prenila (C_5H_9) e na formação do fragmento m/z 278. Outra proposta para o m/z 347 $[M - H]^-$ envolve o rearranjo do hidrogênio e a formação da dupla entre C-1' e C-2'. Nesse caso, ocorre a quebra heterolítica entre C-4 e C-1', resultando

na perda do grupo $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}$ e na formação do fragmento m/z 251. A partir desse fragmento, a quebra homolítica entre C-5 gera o fragmento m/z 182. A Figura 34 ilustra a proposta de fragmentação.

Figura 34. Proposta de fragmentação do composto anotado de isocohumulona, de iso- α -ácidos

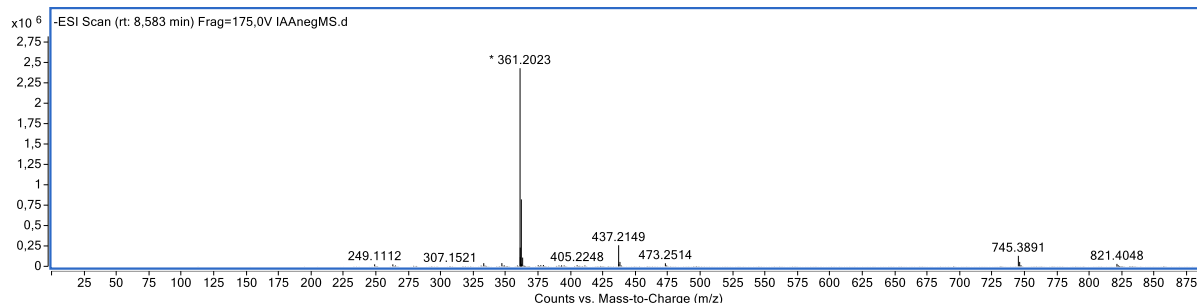


Fonte: A autora.

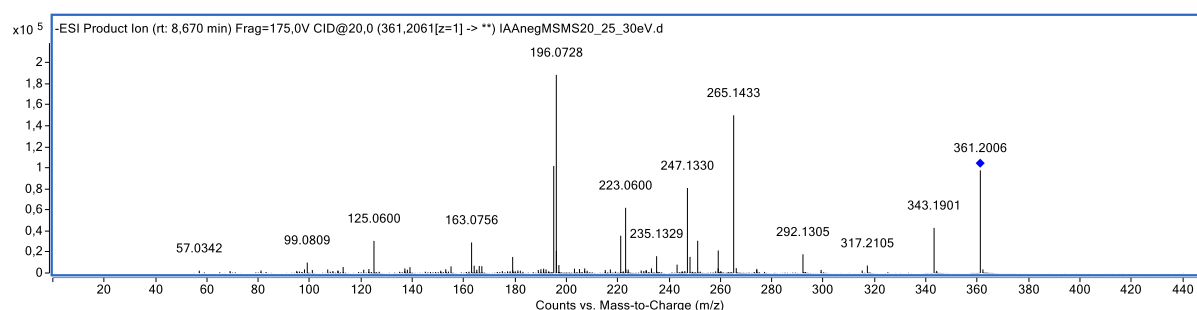
Em relação à amostra de iso- α -ácidos, o espectro de massas exibe a molécula desprotonada em m/z 361,2023 (Figura 35A). A partir dessa molécula, obteve-se o espectro de fragmentação utilizando uma energia de colisão de 20 eV, conforme ilustrado na Figura 35B.

Figura 35. (-) ESI -EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 361,2023 do extrato de lúpulo var. Sabro.

(A)



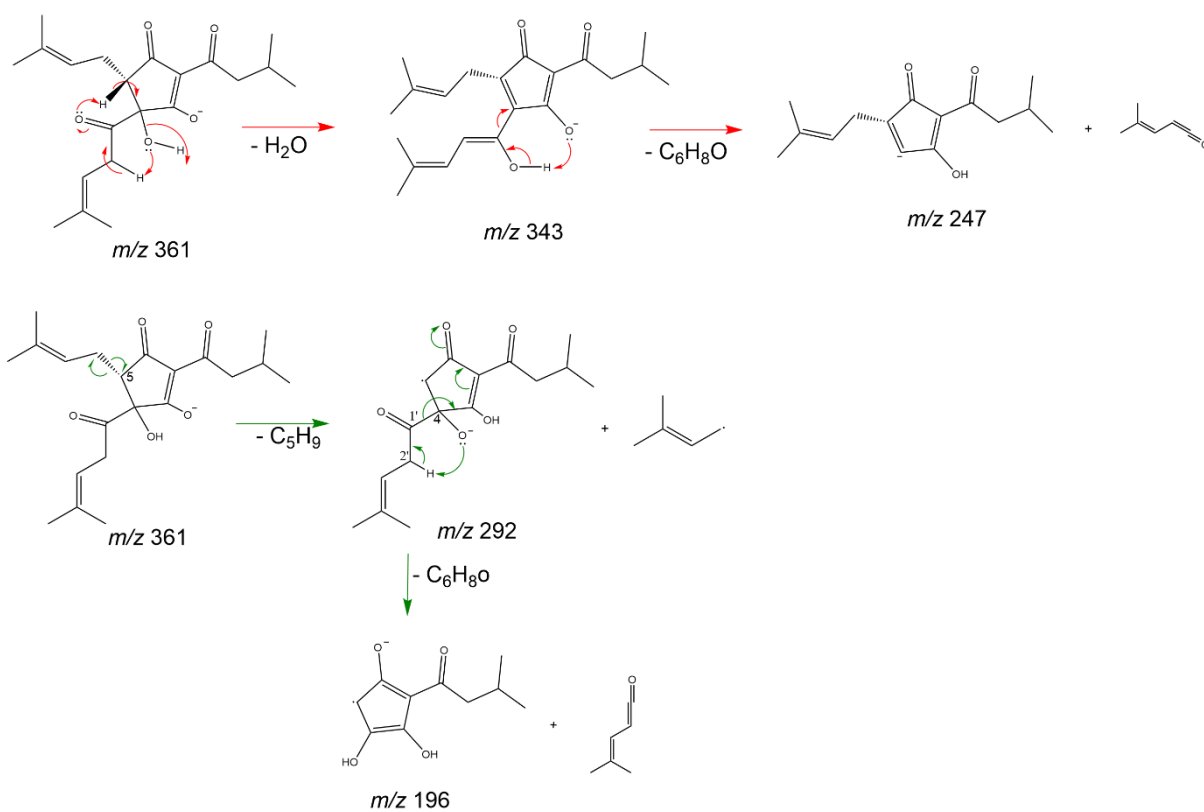
(B)



Fonte: A autora.

A fragmentação da molécula desprotonada em m/z 361 $[M-H]^-$ resulta na perda de água e na reorganização dos hidrogênios na molécula, gerando o fragmento m/z 343. Por meio do mesmo fragmento, com a rearranjo dos hidrogênios e a liberação do grupo C_6H_8O , obtém-se o fragmento m/z 247. Além disso, para a mesma molécula desprotonada em m/z 361 $[M-H]^-$, ocorre a quebra homolítica em C-4, resultando na perda do grupo prenila e na formação do fragmento com m/z 292. A partir do fragmento m/z 292, ocorre um rearranjo de hidrogênio com a formação da dupla ligação entre C-1' e C-2'. Em seguida, ocorre a quebra heterolítica entre C-5 e C-1', resultando na perda do grupo C_6H_8O e na formação do fragmento m/z 196. A figura 36 representa a proposta de fragmentação da molécula desprotonada em m/z 361 $[M-H]^-$.

Figura 36. Proposta de fragmentação do composto anotado de isohumulona/isoadhumulona, de iso- α -ácidos.



Fonte: A autora.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo foram satisfatórios e consistentes com os objetivos propostos. Inicialmente, as etapas de separação e isolamento dos compostos foram essenciais para as análises posteriores, acompanhadas pela caracterização estrutural por meio de RMN. A análise por RMN de ^{13}C confirmou os deslocamentos químicos característicos dos compostos de interesse. A mesma técnica foi empregue na análise de *fingerprint* metabólico aplicada aos extratos de sete variedades comerciais de lúpulo, possibilitando a comparação dos perfis químicos totais das amostras, apresentando semelhanças e diferenças na composição entre as variedades avaliadas. Além disso, a quantificação relativa por RMN - ^1H utilizando um padrão interno permitiu uma estimativa da contribuição dos α -ácidos no extrato de lúpulo da variedade Sabro, demonstrando o potencial da técnica para futuras aplicações quantitativas.

Posteriormente, foram obtidos os perfis eletroquímicos dos α e iso- α -ácidos, permitindo compreender o comportamento eletroquímico dessas classes de compostos. Com base nos resultados obtidos, o estudo foi direcionado para a otimização das condições experimentais empregando um eletrodo de folha de grafite na determinação voltamétrica dos iso- α -ácidos. A análise por CLAE-IES-EM/EM permitiu a anotação dos compostos mais relevantes presentes nas amostras, bem como a proposta de mecanismos de fragmentação dos compostos. Dessa maneira, com as condições otimizadas e sem interferentes significativos nas amostras de cervejas, foi possível quantificar os iso- α -ácidos em cervejas comerciais.

REFERÊNCIAS

- ALMAGUER, Cynthia *et al.* *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289–314, 2014. DOI <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- ARAUJO, Pedro. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 877, n. 23, p. 2224–2234, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030>
- BALOGH, Lajos; DANCZA, István. *Humulus japonicus*, an emerging invader in Hungary. In Tokarska-Guzik B, Brock JH, Brundu G, Child L, Daelher CC; Pyšek P (eds) **Plant Invasions: Human perceptions, ecological impacts and management**. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands. Pp 73-91, 2008.
- BARD, Allen J.; FAULKNER, Larry R. **Electrochemical methods: fundamentals and applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- BARTHHAAS. **Your partner in hops and great flavor: Product Guide**. Nuremberg: BarthHaas GmbH & Co. KG, 2022. Disponível em: <https://www.barthhaas.com/resources/downloads/download/reports-brochures>. Acesso em: 9 jun. 2026.
- BEHRE, Karl-Ernst. The history of beer additives in Europe-a review. **Vegetation History and Archaeobotany**, [s. l.], vol. 8, p. 35–48, 1999. <https://doi.org/10.1007/BF02042841>
- BHARTI, Santosh Kumar; ROY, Raja. Quantitative ¹H NMR spectroscopy. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 5-26, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.007>
- BIZAJ, Katja *et al.* Hop (*Humulus lupulus* L.) Essential oils and xanthohumol derived from extraction process using solvents of different polarity. **Horticulturae**, v. 8, n. 5, p. 368, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050368>
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa n. 65, de 10 de dezembro de 2019**. Brasília, DF: Imprensa Nacional, 2019. Disponível em: <https://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-65-de-10-de-dezembro-de-2019-232666262>. Acesso em: 29 maio 2026.

BRASIL, Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 65**. Brasília, DF: Imprensa Nacional, 2011.

Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0065_29_11_2011.html. Acesso em: 29 maio 2026.

BRETON, Rosemary C.; REYNOLDS, William F. Using NMR to identify and characterize natural products. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 4, p. 501-524, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1039/c2np20104f>

BUCKEE, G. K. Estimation of iso-alpha-acids in beer by HPLC-collaborative trial. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, n. 3, p. 143–148, 1990. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1990.tb01026.x>

BURTON, J. S.; STEVENS, R. Evaluation of hops. XI. The hard resin and presence of hulupinic acid. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 71, p. 51–56, 1965. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1965.tb02024.x>

CADENAS, Raquel *et al.* Brewing with starchy adjuncts: Its influence on the sensory and nutritional properties of beer. **Foods**, v. 10, p. 1726, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods10081726>

CARBONE, Katya; GERVASI, Fabio. An updated review of the genus *Humulus*: a valuable source of bioactive compounds for health and disease prevention. **Plants**, v. 11, p. 3434, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11243434>

CHIANCONE, Benedetta *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**, v. 153, n. 2, p. 295–306, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02462-1>

CLARKE, B. J.; HILDEBRAND, R. P. The isomerization of humulone: I. Isolation of photoisohumulone. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 71, p. 26–36, 1965. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1965.tb02019.x>

COELHO-NETO, Dorval M. *et al.* Chemical concepts involved in beer production: A review. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 1, p. 120–147, 2020. DOI: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200011>

COELHO-NETO, Dorval M. *et al.* Study of the chemical profile of Brazilian beers: an assessment between artisanal and industrial drinks. **Química Nova**, v. 45, n.º5, p. 518–530, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170857>

COMPTON, R. G.; BANKS, Craig E. **Understanding voltammetry**. 4. ed. New Jersey: World Scientific Publishing, 2025. ISBN: 978-1-80061 – 599- 1. DOI: <https://doi.org/10.1142/q0471>

CORRÊA-RIBEIRO, Geyse Adriana *et al.* A fast, direct, and sensitive analysis method for catechin determination in green tea by batch injection analysis with multiple-pulse amperometry (BIA-MP). **Analytical Methods**, v. 10, n. 17, p. 2034–2040, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1039/c8ay00077h>

CORTACERO-RAMÍREZ, Sonia *et al.* Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 7, p. 440–455, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00704-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00704-0)

DE-KEUKELEIRE, Denis. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 108-112, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>

DE SMIDT, Olga *et al.* Comparison of major compounds in essential oils steam distilled from fresh plant material of South African hop varieties. **Life**, v. 15, n. 2, p. 282, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/life15020282>

DE SOUZA, Beatriz C. *et al.* Análise de óleos voláteis de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) Cascade e Chinook cultivados sob clima tropical no estado de São Paulo. **Química Nova**, v. 47, n. 3, p. e-20230109, 2024. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20230109>

DE SOUZA, Djenaine; MACHADO, Sergio A S; AVACA, Luis A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**. V. 26, n. 1, p. 81-89, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000100015>

DÍAZ, Ana Belén *et al.* From the raw materials to the bottled product: influence of the entire production process on the organoleptic profile of industrial beers. **Foods**, v. 11, p. 3215, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11203215>

DURELLO, Renato S.; SILVA, Lucas M.; BOGUSZ, Stanislaw. Hop chemistry. **Quimica Nova**, v. 42, n. 8, p. 900–919, 2019. DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>

EBC - EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Analytica EBC: Beer – 9.8 Bitterness of Beer (IM). 2020. <https://brewup.eu/ebc-analytica/beer/bitterness-of-beer-im/9.8>. Acesso em: 9 jun. 2026.

FARAG, Mohamed A. *et al.* Metabolite profiling and fingerprinting of commercial cultivars of *Humulus lupulus* L. (hop): A comparison of MS and NMR methods in metabolomics. **Metabolomics**, v. 8, p. 492–507, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11306-011-0335-y>

FU, Xiao Gang *et al.* Phylogenomic analysis of the hemp family (Cannabaceae) reveals deep cyto-nuclear discordance and provides new insights into generic relationships. **Journal of Systematics and Evolution**, v. 61, n. 5, p. 806–826, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/jse.12920>

GILES, C. H. *et al.* 786. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. **Journal of the Chemical Society**, v.163, p. 3973–3993, 1960. DOI: <https://doi.org/10.1039/JR9600003973>

GONZÁLEZ, A. G; HERRADOR, M. Á. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 227–238, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2007.01.009>

GRIEVE, Margaret. **A modern herbal**. NEW YORK: DOVER PUBLICATIONS, inc., 1971. vol. 1

GUIDO, Luis F. Sulfites in beer: Reviewing regulation, analysis and role. **Scientia Agricola**, v. 73, n. 2, p. 189-197, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2015-0290>

HASELEU, Gesa; INTELMAANN, Daniel; HOFMANN, Thomas. Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from β -acids of hop (*Humulus lupulus*

L.) upon wort boiling. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 71–81, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.008>

HOEK, Arie C; HERMANS-LOKKERBOL, Ank C J; VERPOORTE, Robert. An improved NMR method for the quantification of α -acids in hops and hop products. **Phytochemical Analysis**, v. 12, n.1, p. 53-57, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1002/1099-1565\(200101/02\)12:1<53::AID-PCA550>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/1099-1565(200101/02)12:1<53::AID-PCA550>3.0.CO;2-E)

HORNINK, Gabriel Gerber (org.). **Controle da qualidade na produção cervejeira: contribuições de estudantes do curso de especialização em Tecnologia e Qualidade em Alimentos**. 1. ed. Alfenas, MG: Edição do autor, 2026. 196 p. ISBN: 978-65-01-96175-0

HORNSEY, I. S. Beer: History and Types. In: CABALLERO, Benjamin; FINGLAS, Paul M.; TOLDRÁ, Fidel (ed.). **Encyclopedia of Food and Health**. Oxford: Academic Press, 2016. p. 345–354. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00057-X>.

HOUGH, J. S.; BRIGGS, D. E.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W. **Malting and Brewing Science: Hopped Wort and Beer**. 2. ed. v. 2. Boston: Springer US, 1982. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1799-3>

HRNČIČ, Maša Knez *et al.* Hop compounds: Extraction techniques, chemical analyses, antioxidative, antimicrobial, and anticarcinogenic effects. **Nutrients**, v. 11, p. 257, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11020257>

HSU, Ying Yu; KAO, Tsai Hua. Evaluation of prenylflavonoids and hop bitter acids in surplus yeast. **Journal of Food Science and Technology**, v. 56, n. 4, p. 1939–1953, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03660-6>

HUNTER, Rebecca A.; DOMPKOWSKI, Eric J. Quantifying beer bitterness: an investigation of the impact of sample preparation. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 11, p. 2009–2012, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.8b00420>

INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. Coordenação-Geral de Acreditação. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Duque de Caxias: Inmetro, 2020.

INTELMANN, Daniel; HASELEU, Gesa; HOFMANN, Thomas. LC-MS/MS quantitation of hop-derived bitter compounds in beer using the ECHO technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 1172–1182, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf803040g>

INTERNATIONAL HOP GROWERS' CONVENTION. **Hop Variety List 2025**. 2025. Disponível em: <https://www.ihgc.org/about/>. Acesso em: 14 jun. 2026.

JAKSE, Jernej; SATOVIC, Zlatko; JAVORNIK, Branka. Microsatellite variability among wild and cultivated hops (*Humulus lupulus* L.). **Genome**, v. 47, n. 5, p. 889–899, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1139/g04-054>

JASKULA, Barbara *et al.* Enhanced quantitative extraction and HPLC determination of hop and beer bitter acids. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, n. 4, p. 381–390, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2007.tb00765.x>

JASKULA-GOIRIS, Barbara; AERTS, Guido; DE COOMAN, Luc. Hop α -acids isomerisation and utilisation: An experimental review. **Cerevisia**, v. 35, n. 3, p. 57–70, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cervis.2010.09.004>

DE-CLIPPELEER, J.; AERTS, G.; DE-COOMAN, L. Beer's Bitter Compounds-A Detailed Review on Iso- α -acids: Current Knowledge of the Mechanisms for their Formation and Degradation. **Brewing Science**, v. 67, n. 11/12 p. 167-182, 2014. DOI: <https://brewingscience.de/index.php/brewingscience/article/view/377>

JOSEPH, Bomi. *Humulus yunnanensis* plant named “Kriya”. Estados Unidos da América. Patente US PP31,477 P3, 25 fev. 2020. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/USPP31477P3/en>. Acesso em: 6 jul. 2026.

JUNIOR, Humberto da Silva *et al.* Determinação colorimétrica de metabissulfito. **Eclética Química**, v. 35, n. 3, p. 133–139, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-46702010000300013>

KARABÍN, Marcel *et al.* Biologically active compounds from hops and prospects for their use. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 3, p. 542–567, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12201>

KHATIB, Alfi *et al.* Isolation of individual hop iso- α -acids stereoisomers by β -cyclodextrin. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 354–357, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.011>

KHATIB, Alfi *et al.* NMR assignment of iso- α -acids from isomerised extracts of *Humulus lupulus* L. cones. **Phytochemical Analysis**, v. 18, n. 5, p. 371–377, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1002/pca.991>

KIM, Ju-Eun *et al.* Water extract of *Humulus japonicus* improves age-related cognitive decline by inhibiting acetylcholinesterase activity and the acetylcholine signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 31, n. 5, p. 131, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3892/mmr.2025.13496>

KIOFENTZOGLOU, Despina *et al.* Antimicrobial activity of chemical hop (*Humulus lupulus*) compounds: a systematic review and meta-analysis. **Applied Sciences** v. 15, n. 14, p.7806, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/app15147806>

KLIMCZAK, Krystian; CIOCH-SKONECZNY, Monika. Changes in beer bitterness level during the beer production process. **European Food Research and Technology**, v. 249, p. 13-22, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00217-022-04154-0>

KOLENC, Zala *et al.* Antimicrobial properties of different hop (*Humulus lupulus*) genotypes. **Plants**, v. 12, n. 1, p. 120, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12010120>

KONTEK, Bogdan *et al.* Antiradical and antioxidant activity *in vitro* of hops-derived extracts rich in bitter acids and xanthohumol. **Industrial Crops and Products**, v. 161, p. 113208, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.113208>

KORPELAINEN, Helena; PIETILÄINEN, Maria. Hop (*Humulus lupulus* L.): traditional and present use, and future potential. **Economic Botany**, v. 75, p. 302-322, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12231-021-09528-1>

KOWALSKA, Grażyna *et al.* The hop cones (*Humulus lupulus* L.): chemical composition, antioxidant properties and molecular docking simulations. **Journal of Herbal Medicine**, v. 33, p. 100566, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100566>

KROFTA, Karel; MIKYŠKA, Alexandr. Hop beta acids: properties, significance and utilization. **Kvasný Průmysl**, v. 60, n.4, p. 96–105, 2014. DOI: <https://doi.org/10.18832/kp2014010>

LAMY, Virginie *et al.* Chemopreventive effects of lupulone, a hop β -acid, on human colon cancer-derived metastatic SW620 cells and in a rat model of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 7, p. 1575–1581, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgm080>

LEMPEREUR, Maëlle *et al.* Tetrahydro-iso-alpha acids antagonize estrogen receptor alpha activity in mcf-7 breast cancer cells. **International Journal of Endocrinology**, v. 2016, p. 9747863, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/9747863>

LI, Shuanghe *et al.* Antibacterial mechanism of hops β -acids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and promote wound healing. **Frontiers in Microbiology**, v. 16, p. 1710545, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1710545>

LOBO, Victor M. M. The definition of electrolyte. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 14, n. 17, p. 27-29, 1996. DOI: https://www.peacta.org/articles_upload/PEA_14_1_1996_27_29.pdf

LU, Min; COMPTON, Richard G. Voltammetric pH sensor based on an edge plane pyrolytic graphite electrode. **Analyst**, v. 139, n. 10, p. 2397–2403, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1039/c4an00147h>

MALOWICKI, Mark G.; SHELLHAMMER, Thomas H. Isomerization and degradation kinetics of hop (*Humulus lupulus*) acids in a model wort-boiling system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4434–4439, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf0481296>

MARRA, Mariana C. *et al.* Enhancing the electrochemical performance of graphite sheet electrodes for ketamine detection. **Electrochimica Acta**, v. 508, p. 145219, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2024.145219>

MASEK, Anna *et al.* Characteristics of compounds in hops using cyclic voltammetry, UV-VIS, FTIR and GC-MS analysis. **Food Chemistry**, v. 156, p. 353–361, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.005>

MCADAM, Erin L. *et al.* Quantitative trait loci in hop (*Humulus lupulus* L.) reveal complex genetic architecture underlying variation in sex, yield and cone chemistry. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 360, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-360>

MCPARTLAND, John M. Cannabis systematics at the levels of family, genus, and species. **Cannabis and Cannabinoid Research**, v. 3, n. 1, p. 203–212, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1089/can.2018.0039>

MICHEL, Maximilian *et al.* The impact of different hop compounds on the growth of selected beer spoilage bacteria in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 126, n. 4, p. 354–361, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1002/jib.624>

MIRCESKI, Valentin; SKRZYPEK, Sławomira; STOJANOV, Leon. Square-wave voltammetry. **ChemTexts**, v. 4, n. 4, p.17, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40828-018-0073-0>

NEVE, R. A. **Hops**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-3106-3>.

NICKERSON, Gail B; WILLIAMS, Peggy A. Varietal differences in the proportions of cohumulone, adhumulone, and humulone in hops. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 44, n. 2, p. 91–94, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-44-0091>

OLIVEIRA, André G.; MUNOZ, Rodrigo Alejandro A.; ANGNES, Lúcio. Disposable graphite foil based electrodes and their application in pharmaceutical analysis. **Electroanalysis**, v. 22, n. 12, p. 1290–1296, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/elan.200900548>

PALMER, John J. **How to brew: everything you need to know to brew beer right the first time**. 3. ed. Boulder, CO: Brewers Publications, 2006. 400 p.

PANIAGUA-GARCÍA, Ana I.; RUANO-ROSA, David; DÍEZ-ANTOLÍNEZ, Rebeca. Fractionation of high-value compounds from hops using an optimised sequential extraction procedure. **Antioxidants**, v. 13, n. 1, p. 45, 2024. DOI: [10.3390/antiox13010045](https://doi.org/10.3390/antiox13010045)

PERSSON, Bengt-Arne; VESSMAN, Jörgen. The use of selectivity in analytical chemistry - some considerations. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 10, p. 526–532, 2001. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(01\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(01)00093-0)

PIASECKI, Bartłomiej; BIERNASIUK, Anna; LUDWICZUK, Agnieszka. Anti-coccal activity and composition of the essential oils and methanolic extracts obtained from brewing quality *Humulus lupulus* L. Hop Pellets. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 8, p. 1098, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ph16081098>

PROTSENKO, Lidia *et al.* Influence of alpha acids hop homologues of bitter and aromatic varieties on beer quality. **Food Technology Ukrainian**, v. 9, n. 2, p. 425-485, 2020. DOI: <https://doi.org/10.24263/2304-974X-2020-9-2-13>

PUSECKER, K; ALBERT, K; BAYER, E. Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of high-performance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal of Chromatography A**, v. 836, n. 2, p. 245-252, 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00054-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00054-0)

RAPINEL, Vincent *et al.* 2-Methyloxolane as a bio-based solvent for green extraction of aromas from hops (*Humulus lupulus* l.). **Molecules**, v. 25, n. 7, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25071727>

RHEAY, Hanah T. *et al.* Phytochemical characterization of native New Mexico hops. **HortTechnology**, v. 30, n. 6, p. 770–772, 2020. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04678-20>

RIBEIRO, Geyse Adriana Corrêa *et al.* Determination of the catechin contents of bioactive plant extracts using disposable screen-printed carbon electrodes in a batch injection analysis (BIA) system. **Microchemical Journal**, v. 146, p. 1249–1254, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.02.058>

RISWANTO, Florentinus Dika Octa *et al.* Metabolite fingerprinting based on ¹H-NMR spectroscopy and liquid chromatography for the authentication of herbal products. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1198, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27041198>

ROSALIN, João Paulo. A trajetória da cerveja no brasil: uma proposta de aproximação com a teoria da sucessão dos meios geográficos. **GEOGRAFIA (Londrina)**, v. 30, n. 1, p. 149-165, 2021. DOI: <https://doi.org/10.5433/2447-1747.2021v30n1p149>

RUDIN, A. D. Solubility of iso-compounds in water and their state in solution. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 66, n. 1, p. 18–22, 1960. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1960.tb01693.x>

RUTNIK, Ksenija; OCVIRK, Miha; KOŠIR, Iztok Jože. Changes in hop (*Humulus lupulus* L.) oil content and composition during long-term storage under different conditions. **Foods**, vol. 11, n. 19, p. 3089, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11193089>

SALEM, Mohamed A. *et al.* Metabolomics in the context of plant natural products research: From sample preparation to metabolite analysis. **Metabolites**, v. 10, n. 1, p. 37, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/metabo10010037>

SAMUEL, Delwen. Archaeology of ancient Egyptian beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 54, n. 1, p. 3–12, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-54-0003>

SANTOS, Sérgio de Paula. **Os Primórdios da Cerveja no Brasil**. 2ed. ed. São Paulo: Ateliê Editorial, 2004.

SCHURR, Benjamin C. *et al.* Molecular mechanisms behind the antimicrobial activity of hop iso- α -acids in *Lactobacillus brevis*. **Food Microbiology**, v. 46, p. 553–563, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.09.017>

SIEGEL, Luz *et al.* Antiangiogenic properties of lupulone, a bitter acid of hop cones. **ANTICANCER RESEARCH**, v. 28, n. 1A, p. 289-294, 2008. DOI: <https://ar.iiarjournals.org/content/28/1A/289>

SILVA, Luiz André Juvêncio *et al.* Evaluation of graphite sheets for production of high-quality disposable sensors. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 833, p. 560–567, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.12.029>

SILVERSTEIN, Robert M.; WEBSTER, Francis X.; KIEMLE, David J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7. ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2005. ISBN: 0-471-39362-2

SKOOG, Douglas *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8ªed. São Paulo: Cengage Learning, 2006. ISBN: 85-221-0436-0

SMALL, Ernest. A Numerical and Nomenclatural Analysis of Morpho-Geographic Taxa of *Humulus*. **Systematic Botany**, v. 3, n. 1, p. 37-76, 1978. DOI: <https://doi.org/10.2307/2418532>

SUN, Jaw Long *et al.* The Extract of *Humulus japonicus* inhibits lipogenesis and promotes lipolysis via PKA/p38 signaling. **Obesity Facts**, v. 17, n. 5, p. 513–523, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1159/000540699>

SUNG, Bokyoung *et al.* *Humulus japonicus* extract exhibits antioxidative and anti-aging effects via modulation of the AMPK-SIRT1 pathway. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 9, n. 5, p. 1819–1826, 2015. DOI: 10.3892/etm.2015.2302

TEMBROCK, Luke R; MCALEER, Jenna M; GILLIGAN, Todd M. A revision of native north American *Humulus* (Cannabaceae). **Journal of the Botanical Research Institute of Texas**, v. 10, n. 1, p. 11-30, 2016. DOI: <https://www.jstor.org/stable/44858817>

THESELING, Florian A. *et al.* A hands-on guide to brewing and analyzing beer in the laboratory. **Current protocols in microbiology**, v. 54, p. e91, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1002/cpmc.91>

TING, Patrick L.; RYDER, David S. The bitter, twisted truth of the hop: 50 years of hop chemistry. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 75, n. 3, p. 161-180, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-3638-01>

VERZELE, M.; DE KEUKELEIRE, Denis. **Chemistry and analysis of hop and beer bitter acids**. Amsterdam: Elsevier, 1991. (Developments in Food Science, v. 27). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/bookseries/developments-in-food-science/vol/27/suppl/C>. Acesso em: 7 jul. 2026.

WANG, Joseph. **Analytical electrochemistry**. New York: Wiley-VCH, 2000. ISBN 0-471-22823-0

WANG, Feng *et al.* Antioxidative stress effects of *Humulus japonicus* extracts on neuronal PC12 cells. **Food Science and Technology**, v. 42, p. e101921, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1590/fst.101921>

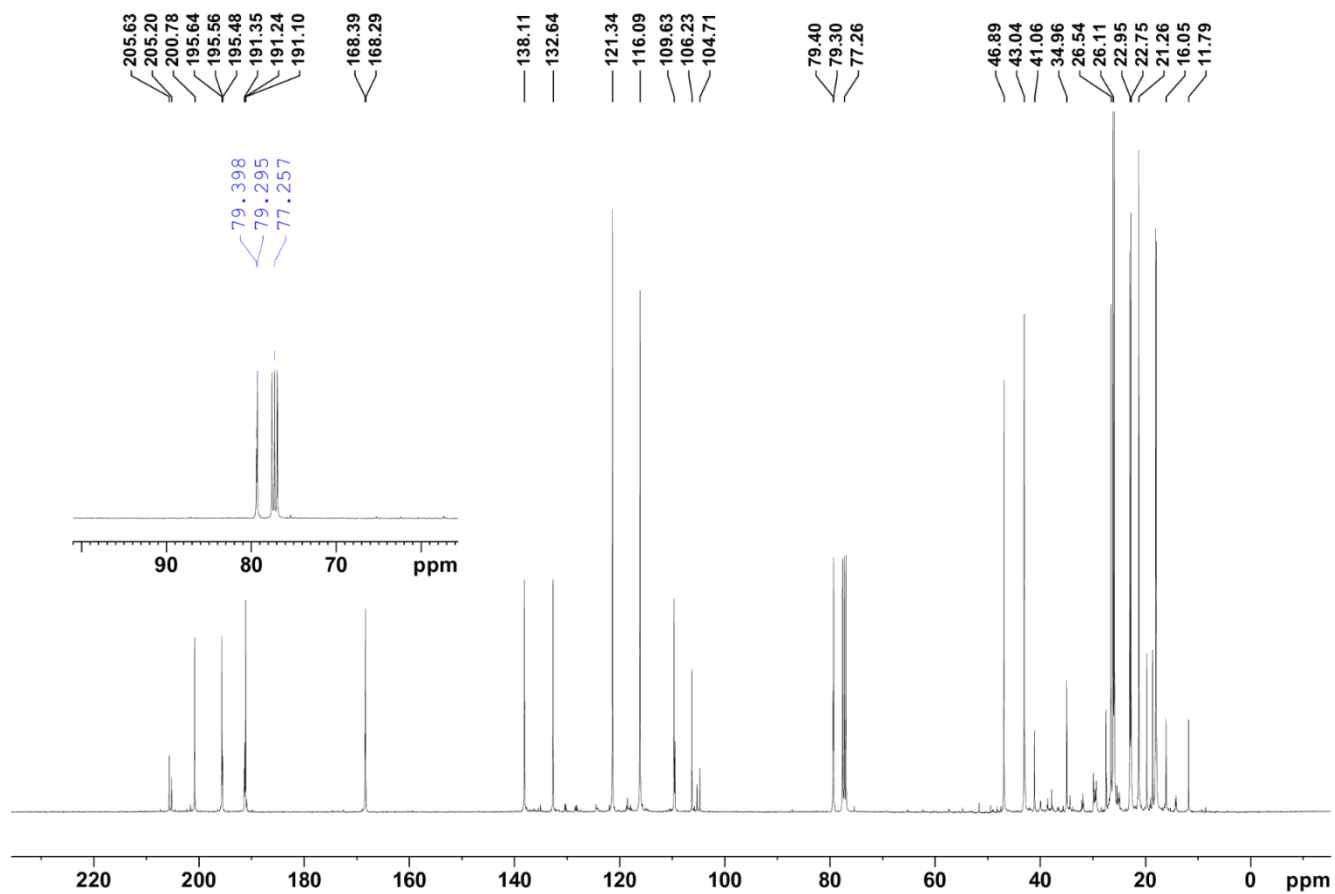
WASMUHT, Isabel. Relevant process steps influencing wort and beer composition and its quality: A review. **Brewing Science**, v. 76, n. 9–10, p. 113–129, 2023. DOI: <https://doi.org/10.23763/BrSc23-15wasmuht>

WOLFENDER, Jean Luc *et al.* Accelerating metabolite identification in natural product research: toward an ideal combination of Liquid Chromatography-High-Resolution Tandem Mass Spectrometry and NMR Profiling, *in Silico* databases, and chemometrics. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 704-742, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05112>

YANG, Zhenhua *et al.* Effect of HCl on spectral properties of sulfur dioxide and its derivatives dissolved in water. **Procedia Environmental Sciences**, v. 18, p. 92–99, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proenv.2013.04.013>

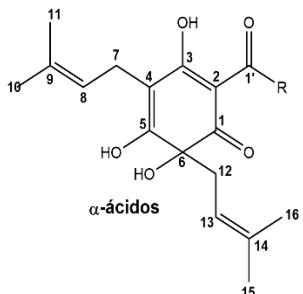
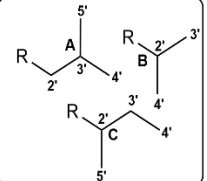
ZIEMAH, James; ULLRICH, Matthias S.; KUHNERT, Nikolai. Antibacterial Activity Potential of Industrial Food Production Waste Extracts against Pathogenic Bacteria: Comparative Analysis and Characterization. **Foods**, v. 13, n. 12, p. 1902, 17 jun. 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods13121902>.

APÊNDICE

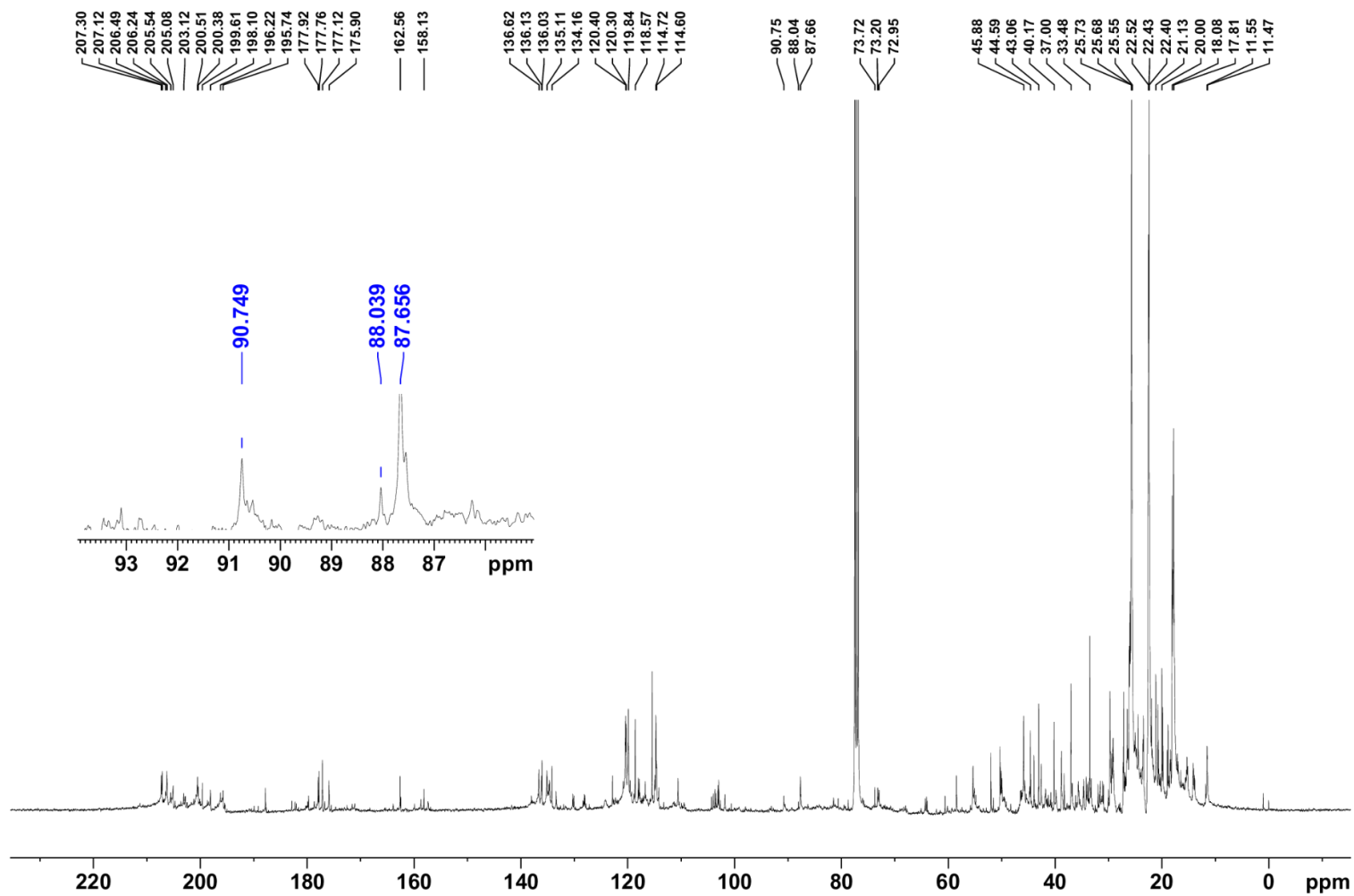
Figura S1: Espectro de RMN de ^{13}C de α -ácidos.

Fonte. A autora.

Tabela S1. Tabela de deslocamento químico de ^{13}C de RMN dos α -ácidos.

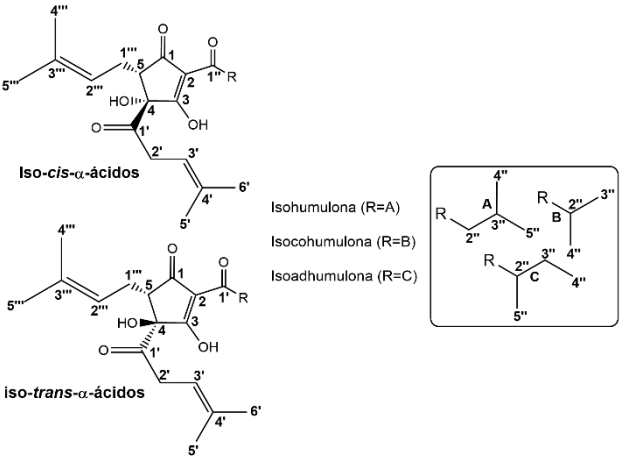
Estruturas α -ácidos	Posição	Amostra ^{13}C δ ppm CDCl_3 - 100MHz	Referência ^{13}C δ ppm CDCl_3 -75,4MHz
		Faixa de - α -ácidos	Faixa de - α -ácidos
 Humulona (R=A) Cohumulona (R=B) Adhumulona (R=C) α-ácidos	1	195,38 – 195,54	195,32 – 195,47
	2	104,61 – 105,64	104,38 – 105,87
	3	190,81 – 191,25	190,54 – 191,11
	4	109,35 – 109,53	108,76 – 109,36
	5	168,15 – 168,29	167,96 – 169,21
	6	79,19 – 79,30	78,97 – 79,16
	7	20,94 – 21,37	20,67 – 21,06
	8	121,25 – 121,86	121,07 – 121,15
	9	132,54	131,44 – 132,35
	10	25,31 – 25,80	25,29 – 25,62
	11	17,82 – 17,90	17,1 – 17,66
	12	42,94	42,02 – 42,77
	13	-	115,17 – 115,95
	14	137,95 – 138,02	136,91 – 137,75
	15	25,31 – 25,80	25,41 – 25,83
	16	17,82 – 17,90	17,24 – 17,63
 Humulona Cohumulona Adhumulona	1'	200,67	200,77
	2'	46,79	46,79
	3'	26,01	26,19
	4'	22,85	22,65
	5'	22,65	22,45
	1'	205,53	205,34
	2'	34,85	34,59
	3'	18,90	18,97
	4'	18,53	18,0
	1'	205,10	204,90
	2'	40,97	40,80
	3'	27,36	27,20
	4'	11,69	11,51
	5'	15,95	15,82

Fonte: A autora.

Figura S2. Espectro de RMN de ^{13}C de iso- α -ácidos.

Fonte: A autora.

Tabela S2. Tabela de deslocamento químico de ^{13}C de RMN dos iso- α -ácidos.

Estruturas Iso- α -ácidos	Posição	Amostra ^{13}C δppm CDCl_3 - 100MHz	Referência ^{13}C δppm CDCl_3 - 125MHz
		Faixa de iso- α - ácido	Faixa de iso- α - ácido
 Iso-<i>cis</i>-α-ácidos Isohumulona (R=A) Isocohumulona (R=B) Isoadhumulona (R=C) Iso-<i>trans</i>-α-ácidos	1	205,08 - 207,30	204,9 - 206,3
	2	110,59	109,2 - 110,7
	3	195,47 - 196,22	195,1 - 195,6
	4	87,66 - 90,75	87,5 - 90,5
	5	49,13 - 55,35	49,8 - 55,3
	1'	203,12 - 207,30	205,4 - 207,0
	2'	36,79 - 41,77	36,8 - 41,7
	3'	114,16 - 114,90	114,4 - 114,8
	4'	136,03 - 136,62	136,2 - 136,9
	5'	17,81 - 18,99	17,9 - 18,4
	6'	25,69 - 26,48	25,7 - 26,0
	1'''	23,45 - 26,48	23,3 - 26,6
	2'''	119,84 - 120,82	119,6 - 120,4
	3'''	134,17 - 135,11	134,6 - 135,4
	4'''	17,91 - 18,99	17,99 - 18,3
	5'''	25,69 - 26,48	25,7 - 26,0
	Humulona		
	1''	198,10 - 200,51	197,8 - 200,6
	2''	44,59 - 46,46	44,4 - 46,0
	3''	26,12 - 26,48	26,5 - 26,0
	4''	21,93 - 22,59	22,5 - 22,7
	5''	21,93 - 22,59	22,5 - 22,7
	Cohumulona		
	1''	203,12 - 205,54	203,4 - 205,6
	2''	34,63 - 35,65	34,6 - 35,8
	3''	18,08 - 18,99	18,0 - 18,0
	4''	18,08 - 18,99	18,0 - 18,0
	Adhumulona		
	1''	203,12 - 205,08	203,0 - 204,9
	2''	36,79 - 41,77	36,8 - 41,0
	3''	23,45 - 26,48	23,6 - 26,3
	4''	11,55 - 11,81	11,7 - 11,4
	5''	15,18 - 15,31	15,1 - 15,7

Fonte: A autora.

Figura S3. Cromatograma do extrato de *Humulus lupulus* da variedade Sabro.

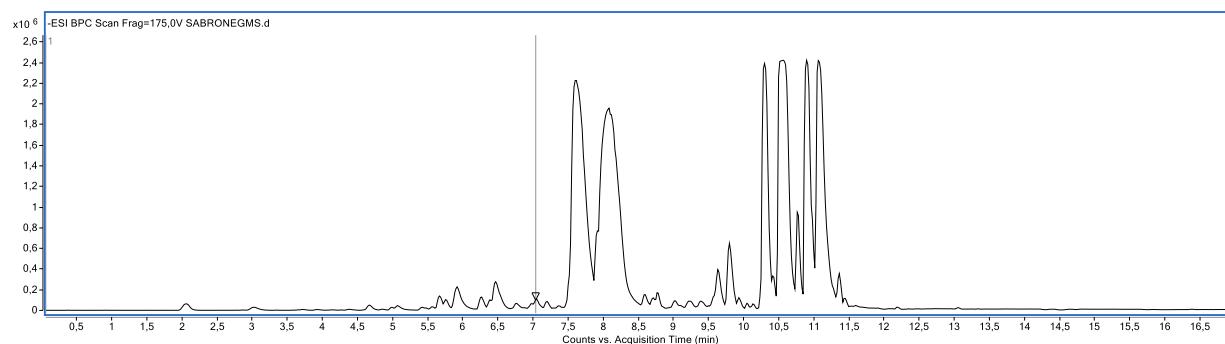
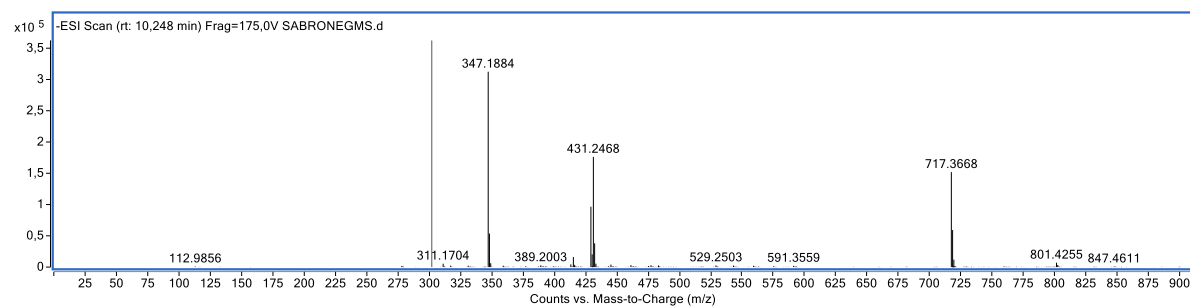


Figura S4. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 347,1884 do extrato de *H. lupulus* var. Sabro.

(A)



(B)

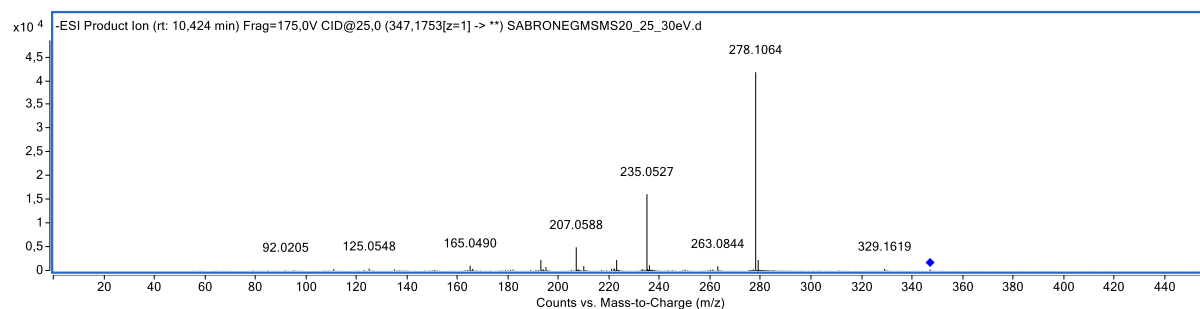
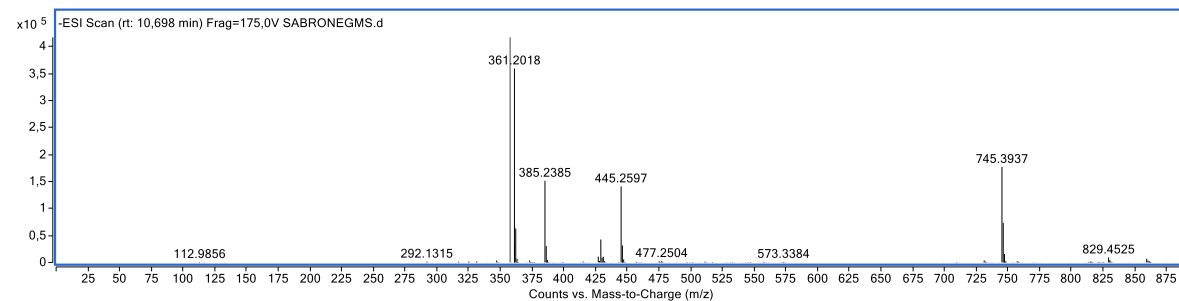


Figura S5. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 361,2018 do extrato de *H. lupulus* var. Sabro.

(A)



(B)

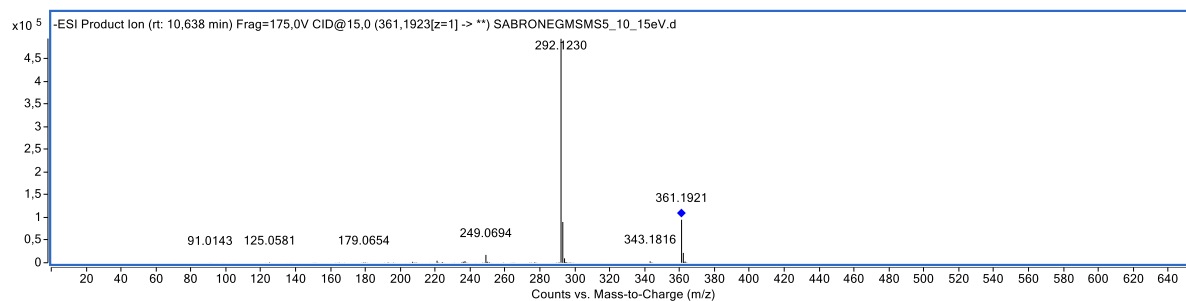
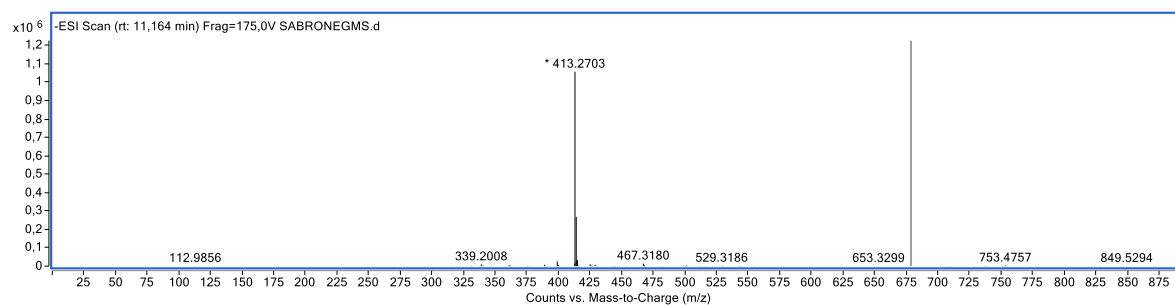


Figura S6. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 413,2703 do extrato de *H. lupulus* var. Sabro.

(A)



(B)

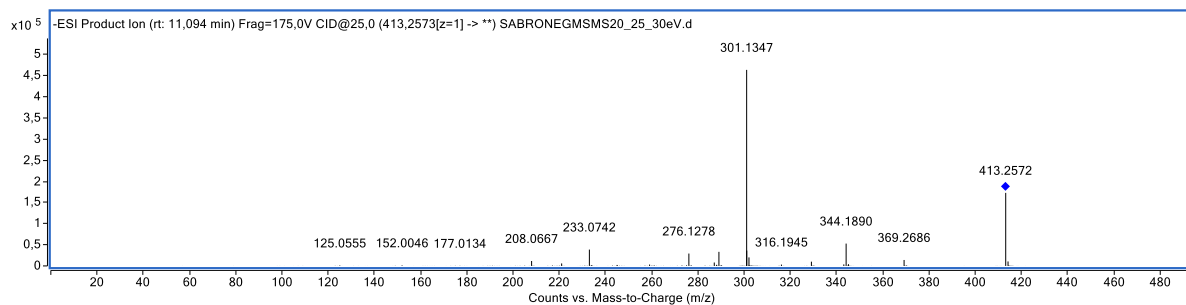
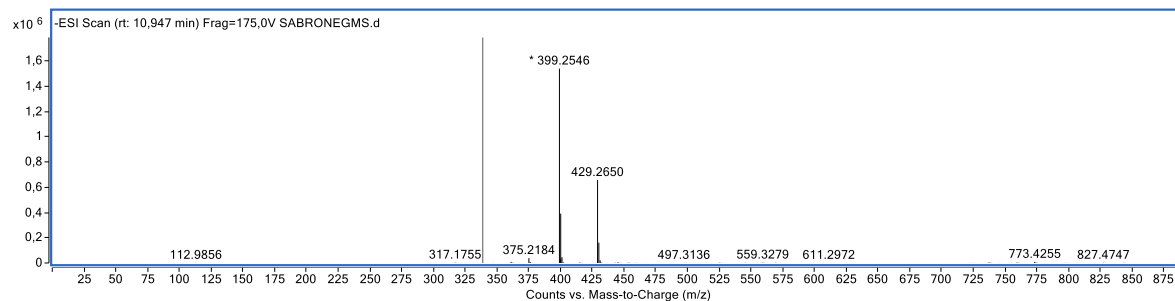


Figura S7. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 399,2546 do extrato de *H. lupulus* var. Sabro.

(A)



(B)

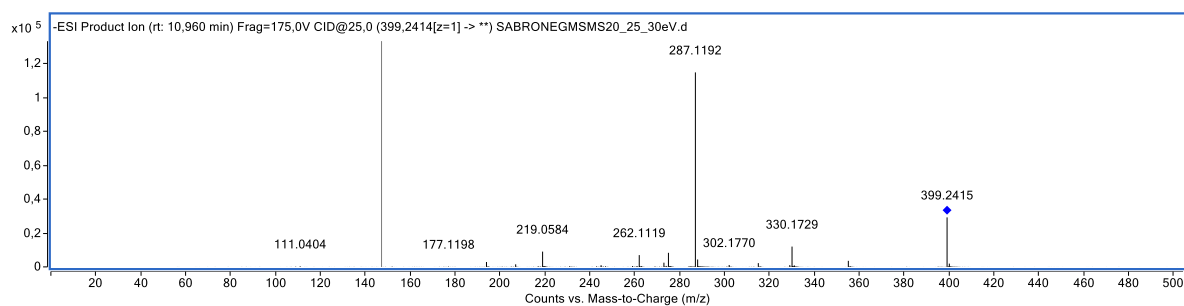
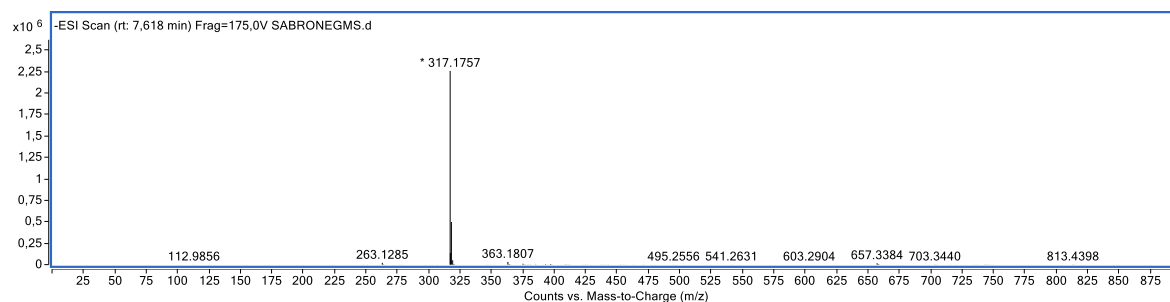


Figura S8. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 317,1757 do extrato de *H. lupulus* var. Sabro.

(A)



(B)

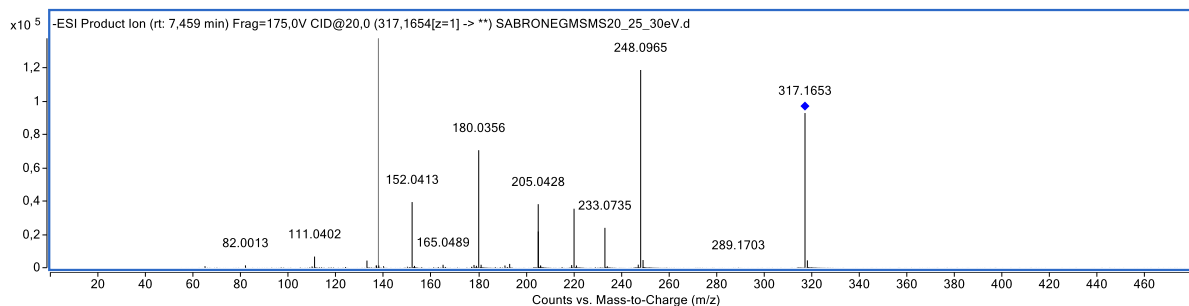
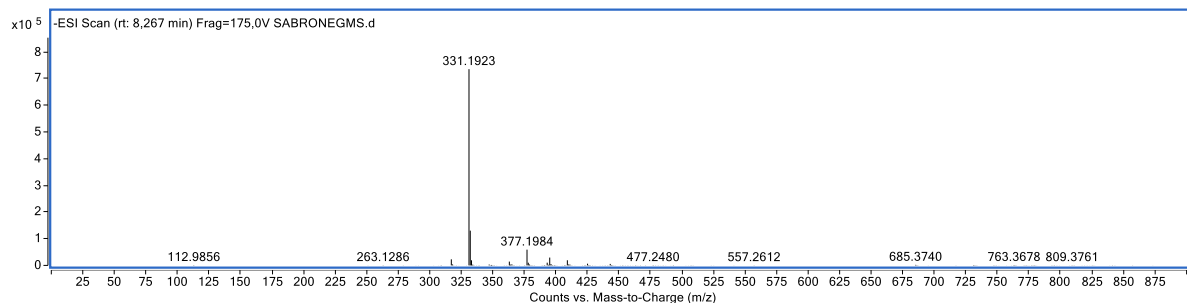


Figura S09. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 331,1923 do extrato de *H. lupulus* var. Sabro.

(A)



(B)

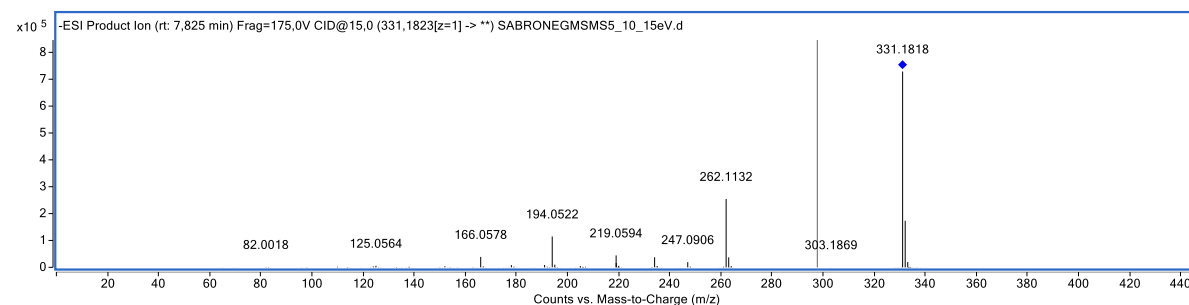
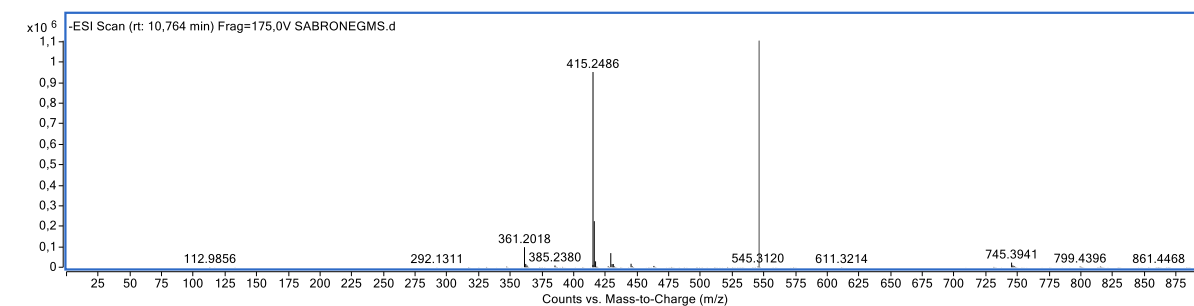


Figura S10. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 415,2486 do extrato de *H. lupulus* var. Sabro.

(A)



(B)

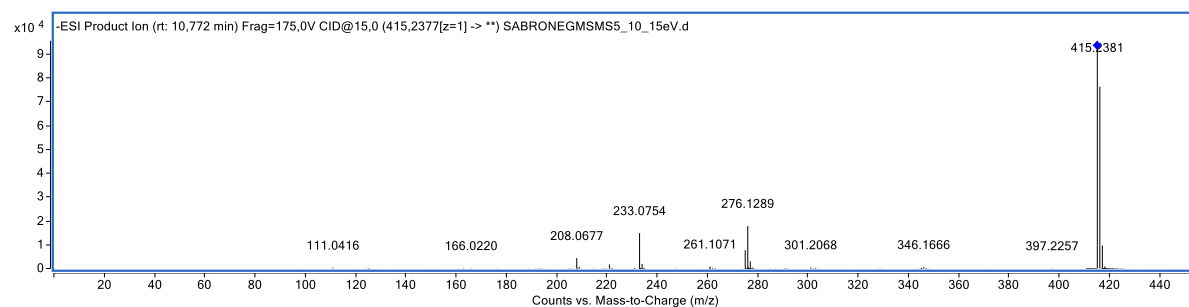
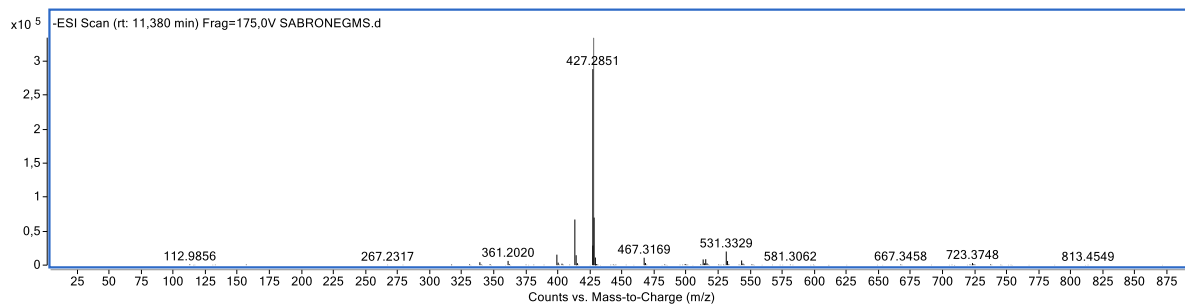


Figura S11. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 427,2851 do extrato de *H. lupulus* var. Sabro.

(A)



(B)

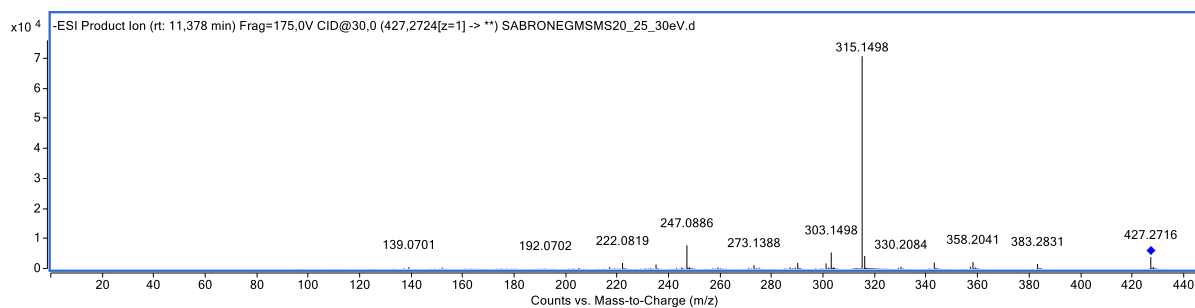
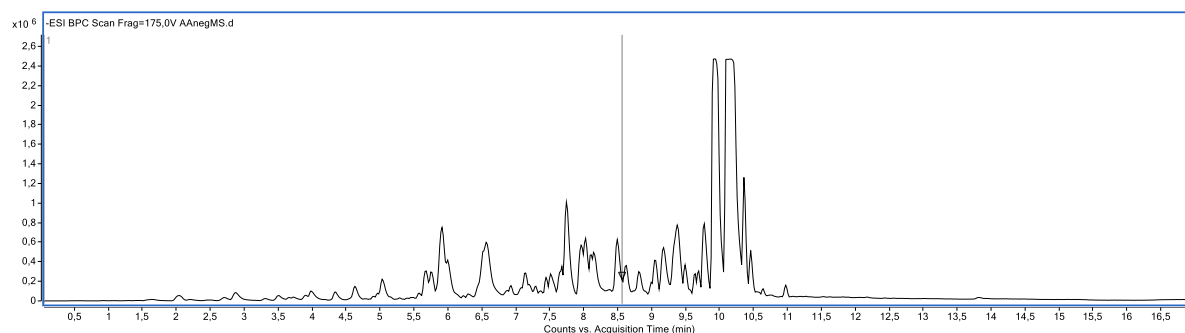
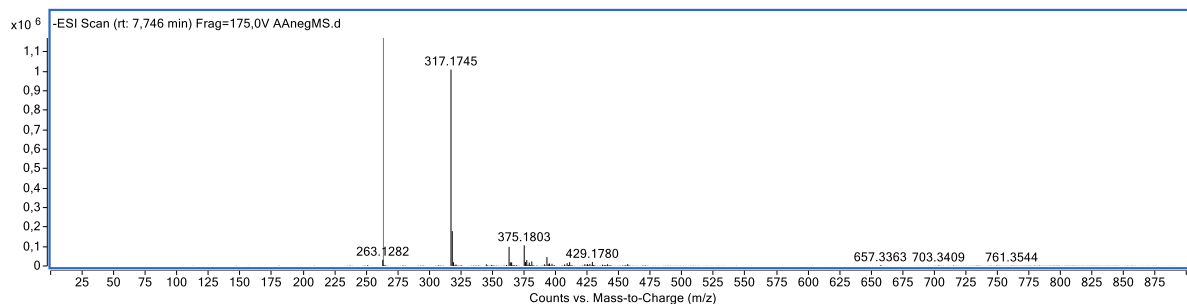


Figura S12. Cromatograma do extrato de α - ácidos da variedade Sabro em modo negativo.Figura S13. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 317,1745 do A-ácido var. Sabro.

(A)



(B)

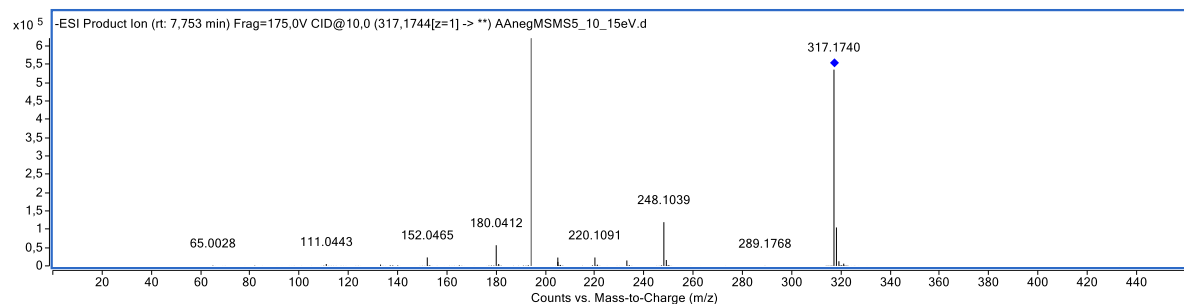
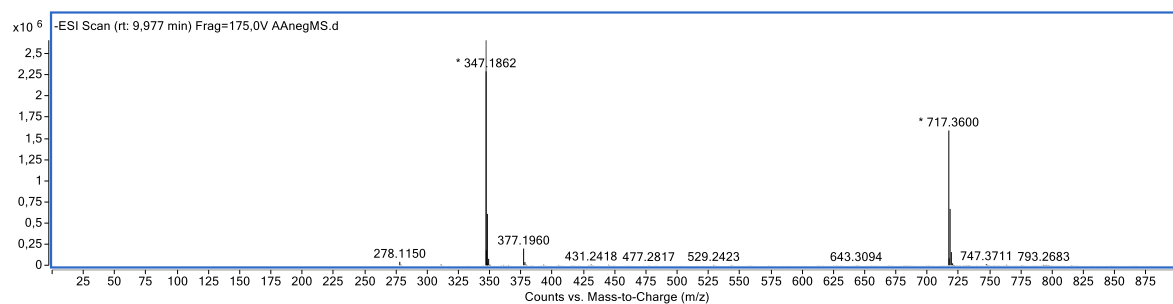
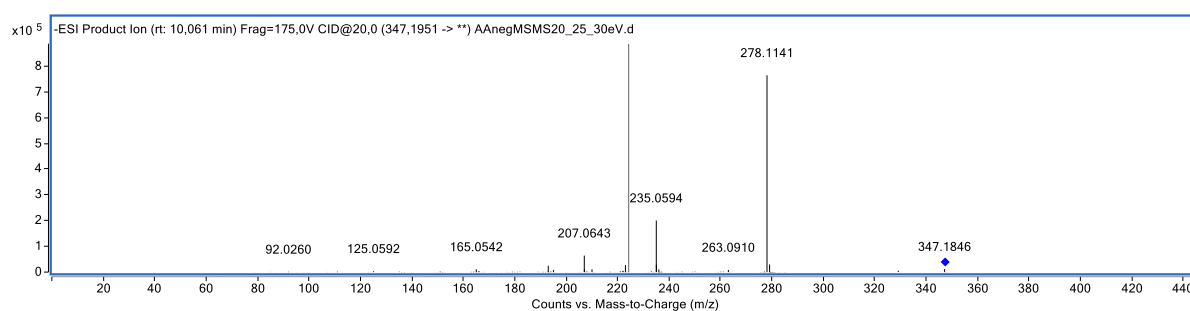


Figura S14. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 347,1862 do α -ácido var. Sabro.

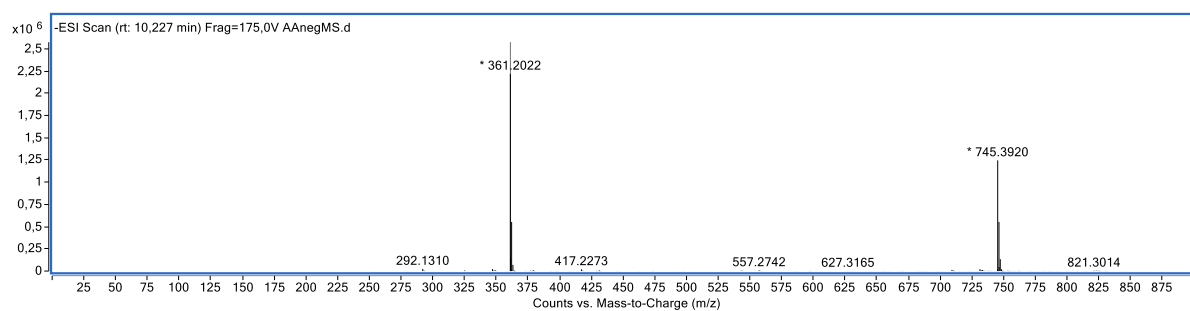
(A)



(B)

Figura S15. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 361,2022 do α -ácido var. Sabro.

(A)



(B)

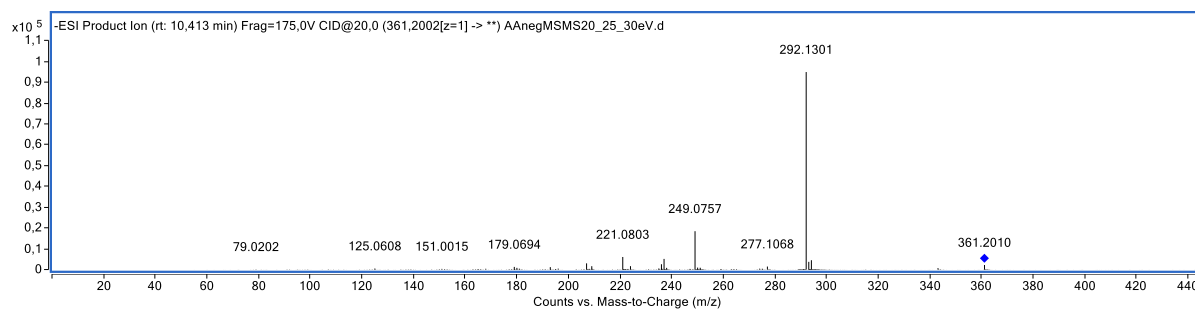
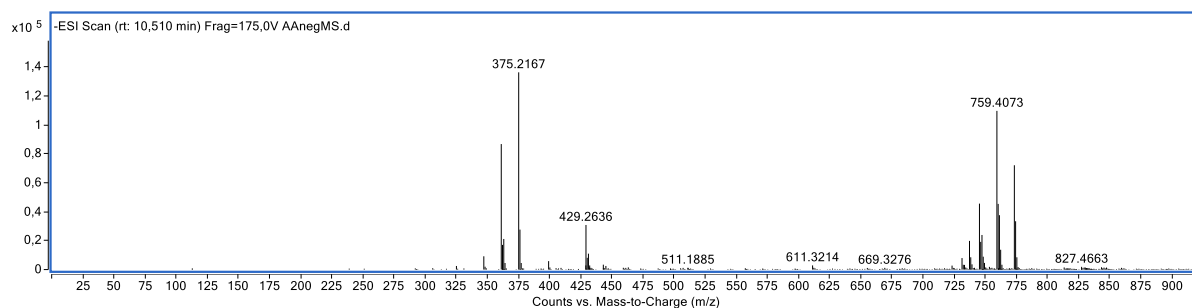


Figura S16. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 375,2157 do α -ácido var. Sabro.

(A)



(B)

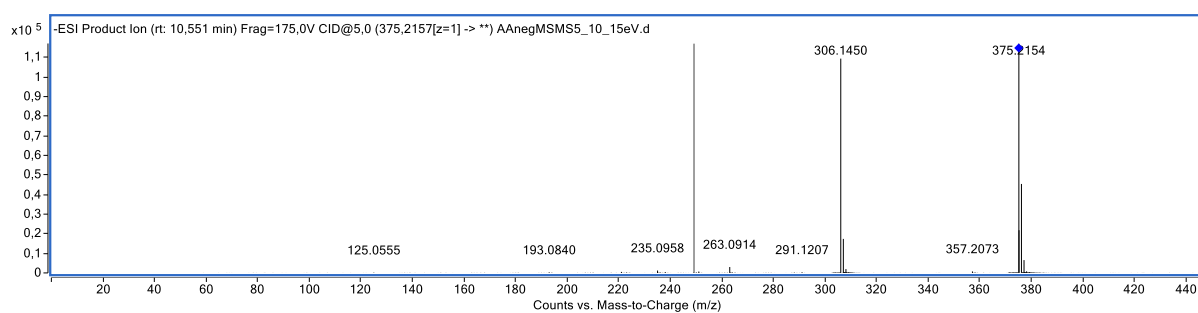
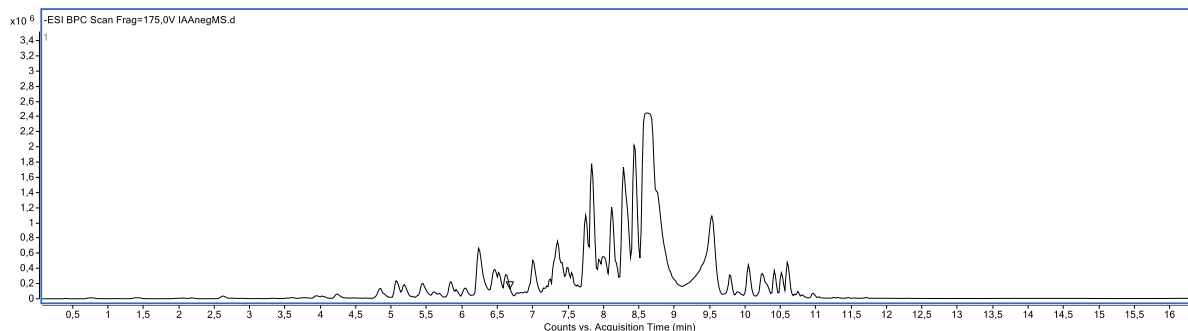
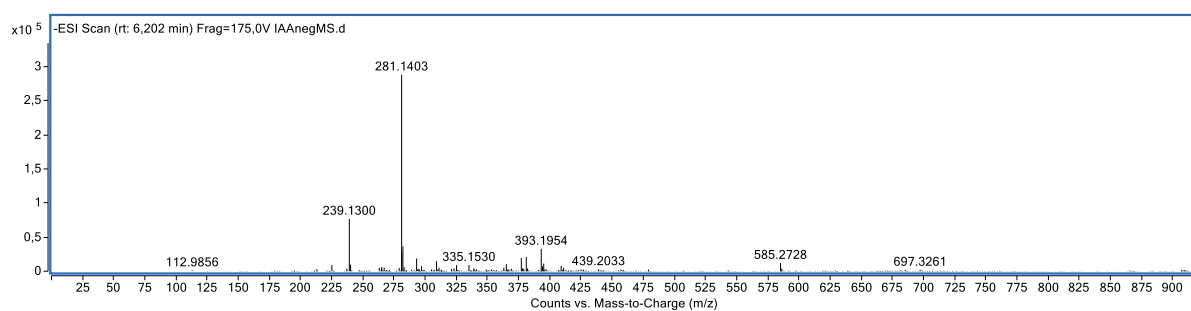


Figura S17. Cromatograma de iso- α -ácido em modo negativo.Figura S18. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 281,1403 de iso- α -ácido var. Sabro.

(A)



(B)

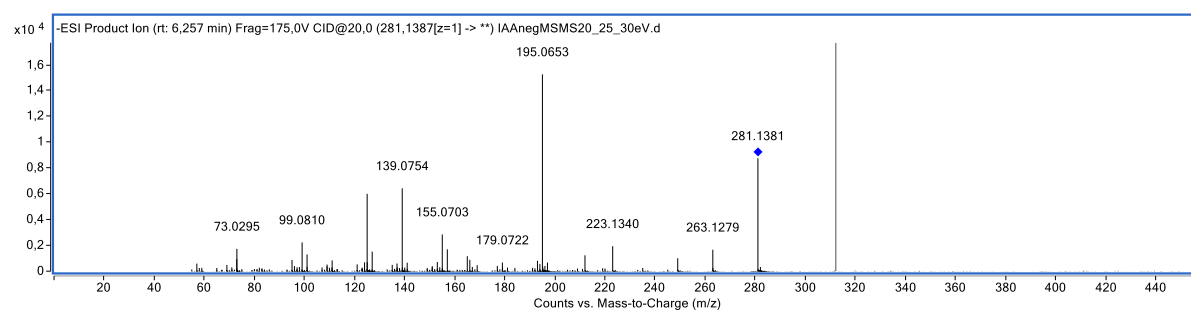
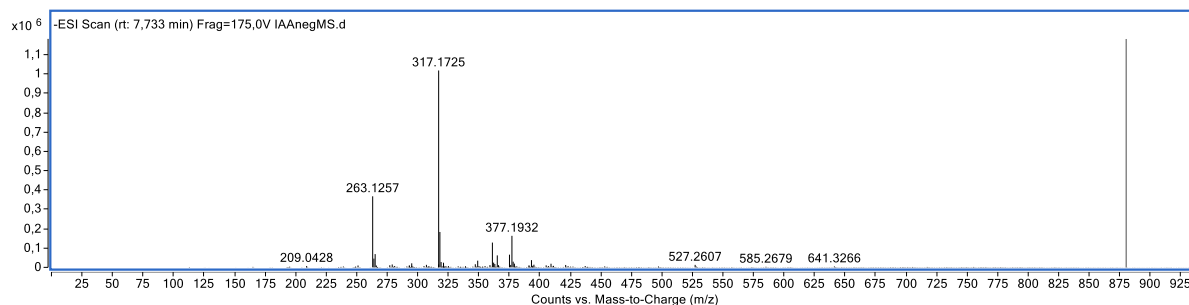
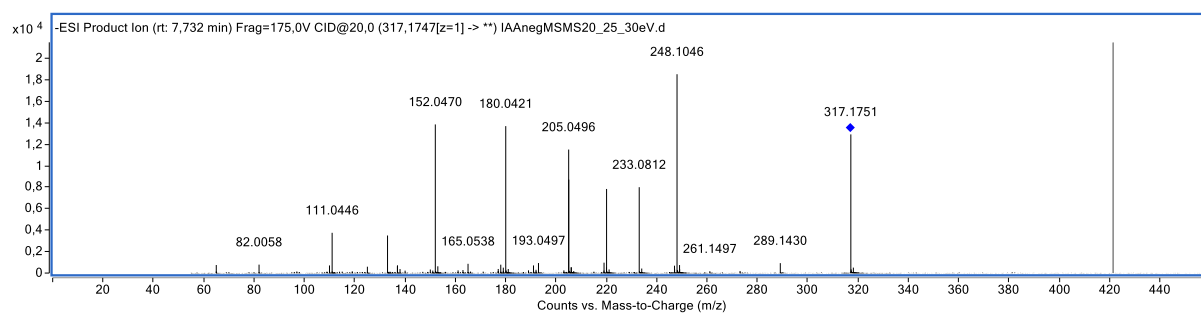


Figura S19. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 317,1725 de iso- α -ácido var. Sabro.

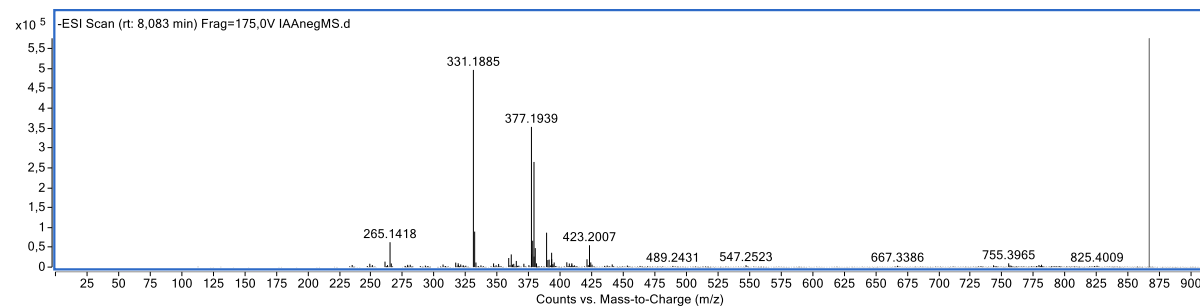
(A)



(B)

Figura S20. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 331,1885 de iso- α -ácido var. Sabro.

(A)



(B)

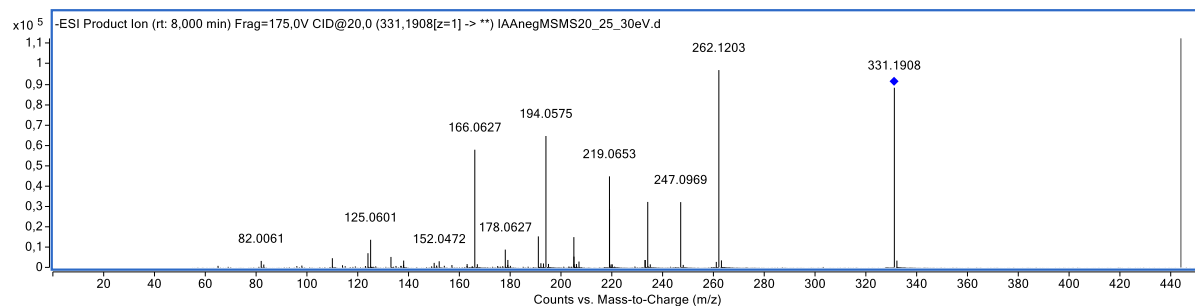
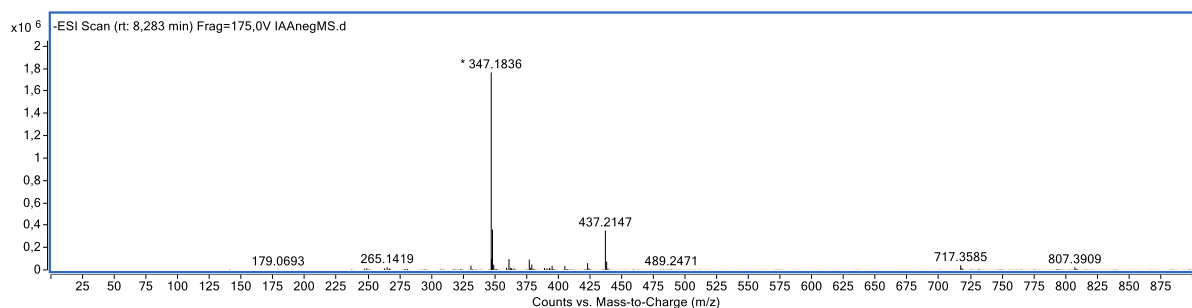
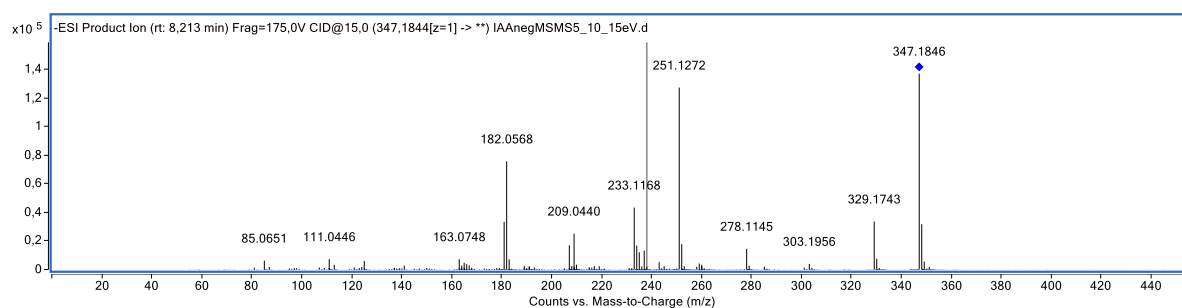


Figura S21. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 347,1836 de iso- α -ácido var. Sabro.

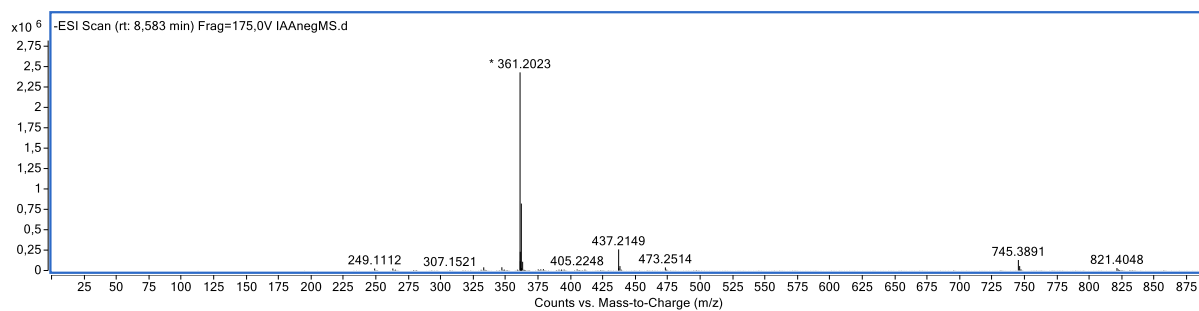
(A)



(B)

Figura S22. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 361,2023 de iso- α -ácido var. Sabro.

(A)



(B)

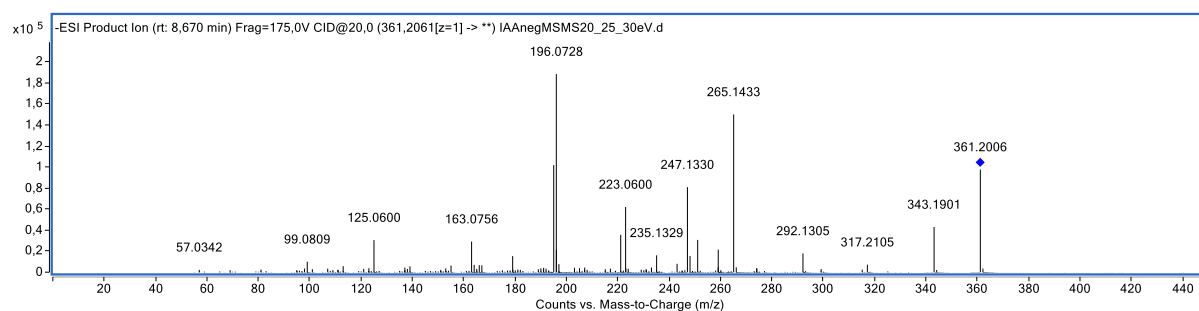


Figura S23. Cromatograma do extrato de isoctano da amostra de cerveja BS1 em modo negativo.

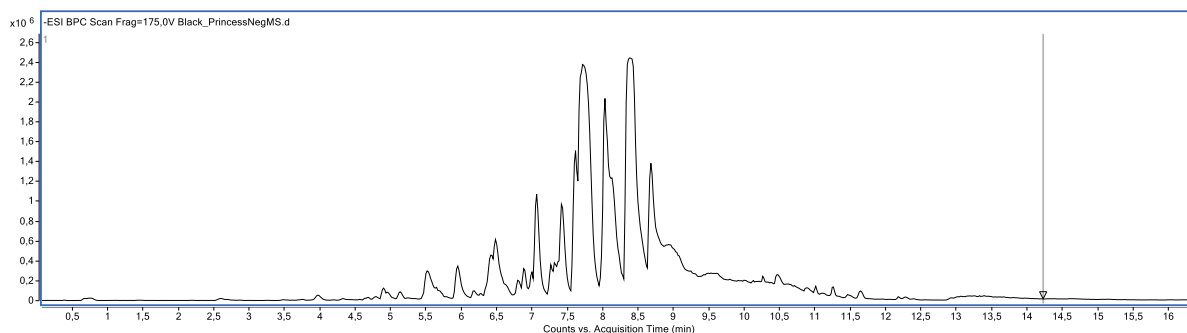
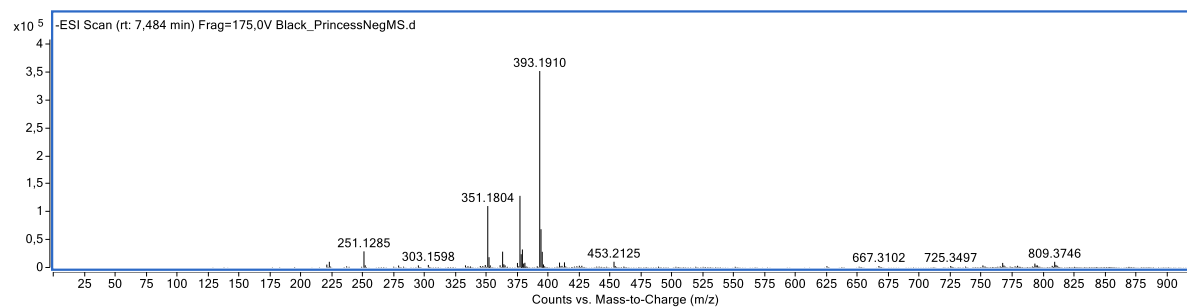


Figura S24. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 393,1910 da amostra de cerveja BS1.

(A)



(B)

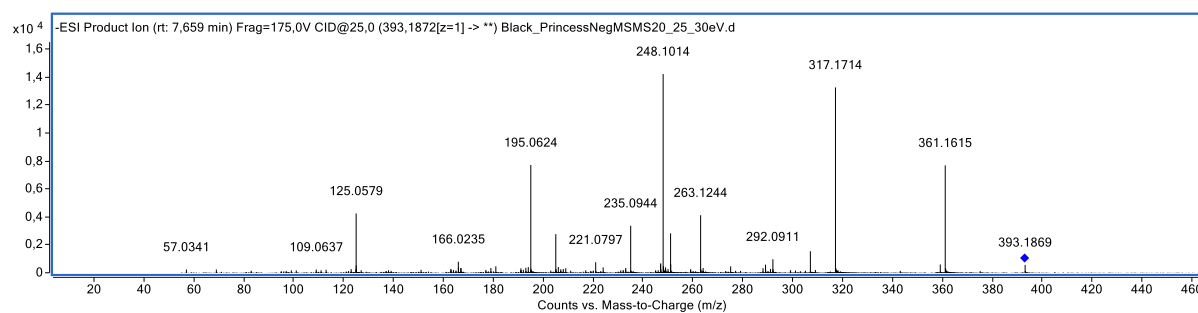
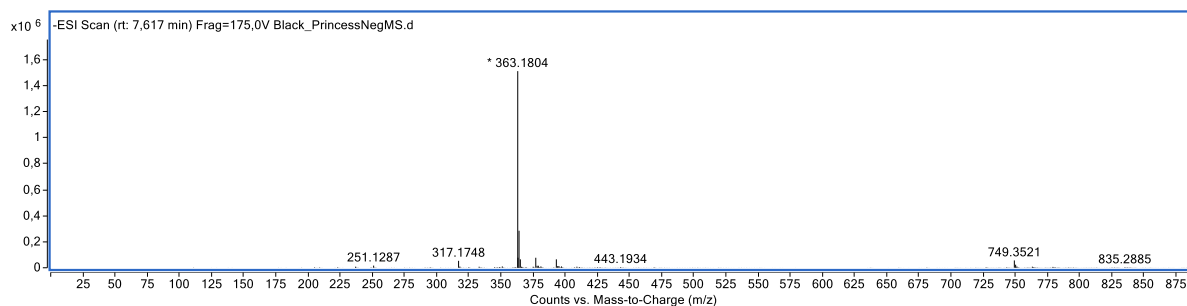
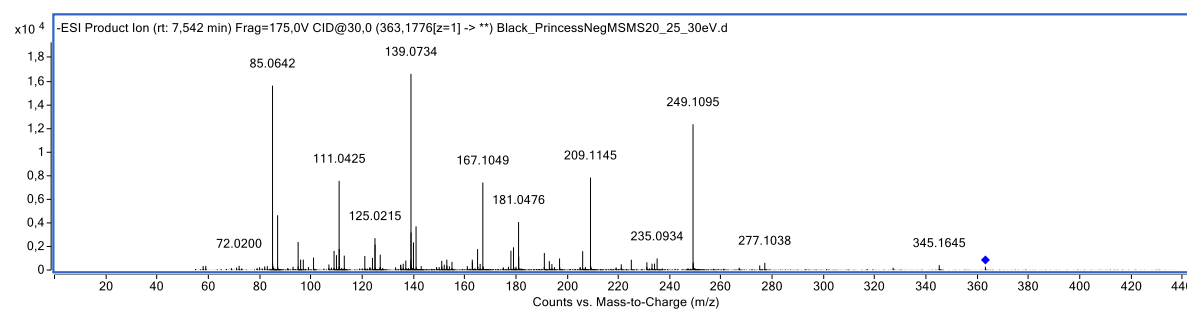


Figura S25. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 363,1804 da amostra de cerveja BS1.

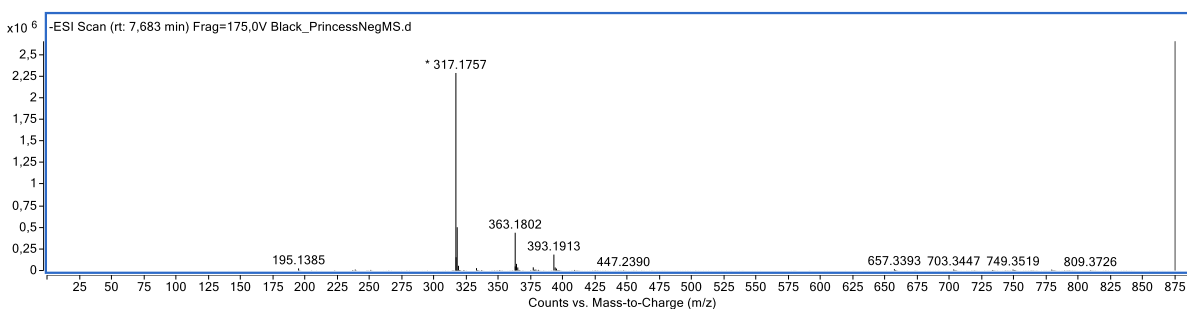
(A)



(B)

Figura S26. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 317,1757 da amostra de cerveja BS1.

(A)



(B)

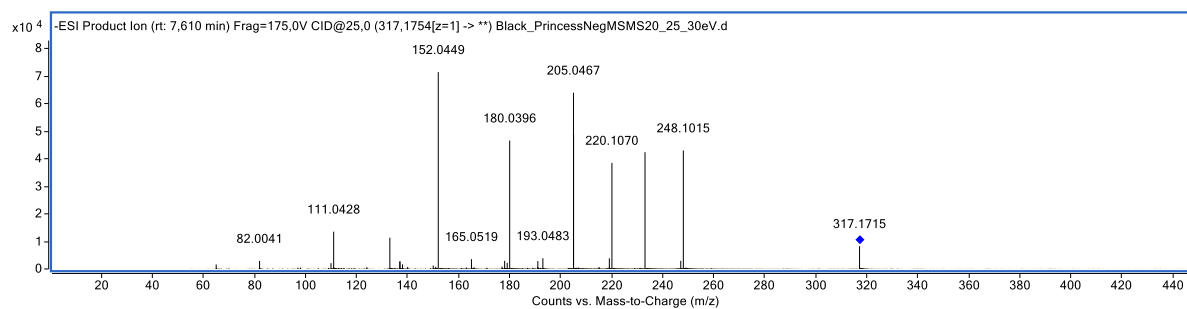
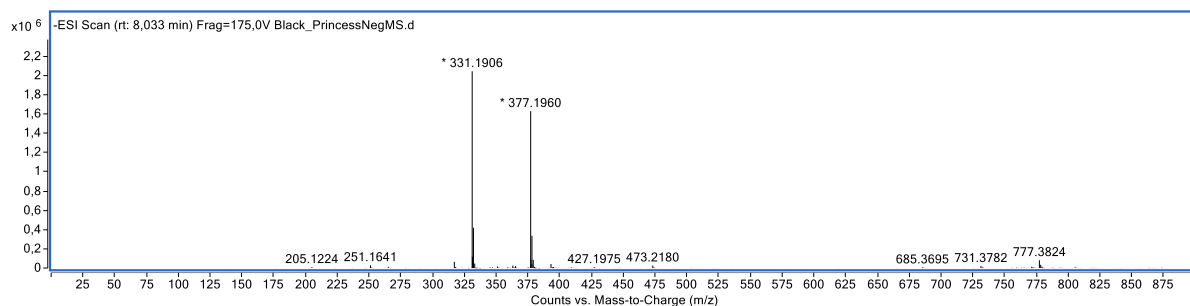
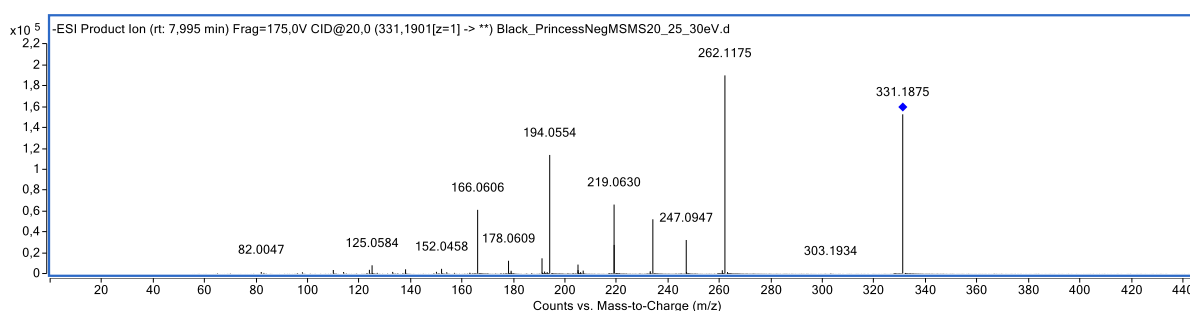


Figura S27. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 331,1906 da amostra de cerveja BS1.

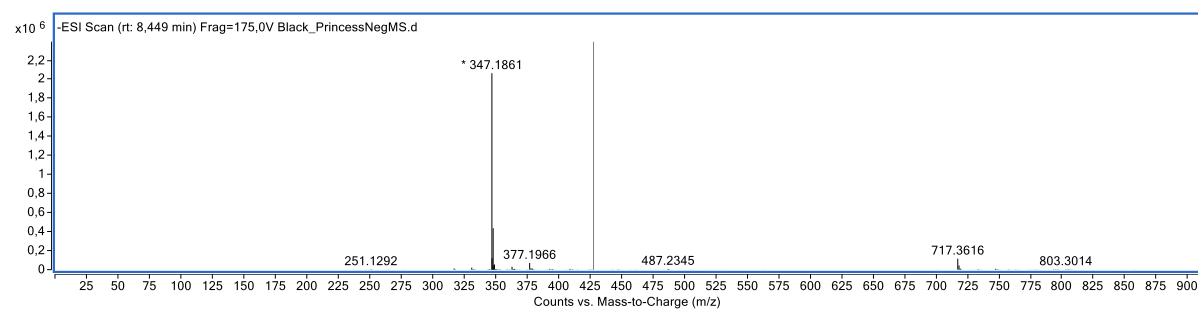
(A)



(B)

Figura S28. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 347,1864 da amostra de cerveja BS1.

(A)



(B)

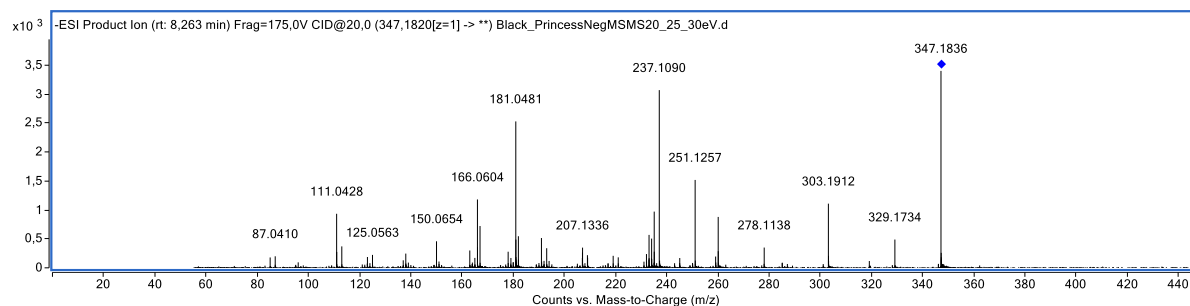
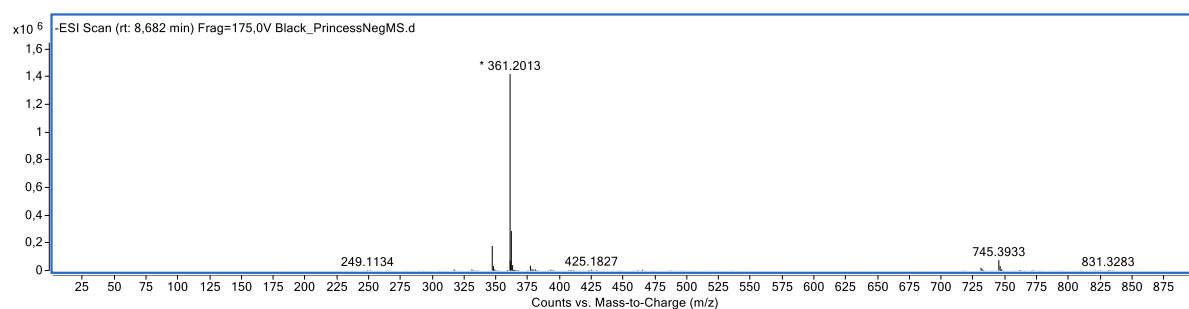


Figura S29. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 361,2013 da amostra de cerveja BS1.

(A)



(B)

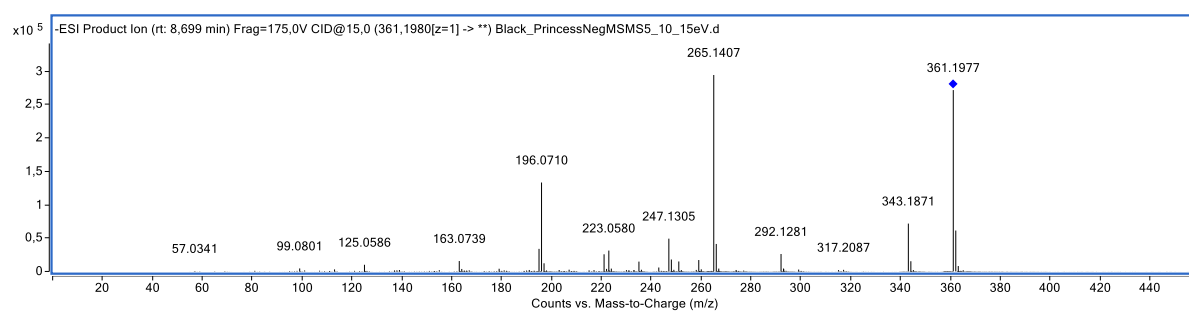


Figura S30. Cromatograma do extrato de isooctano da amostra de cerveja BS2 em modo negativo.

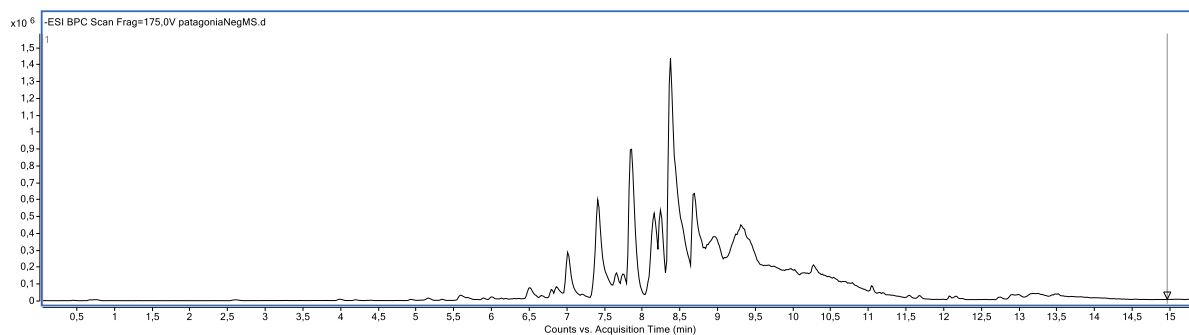
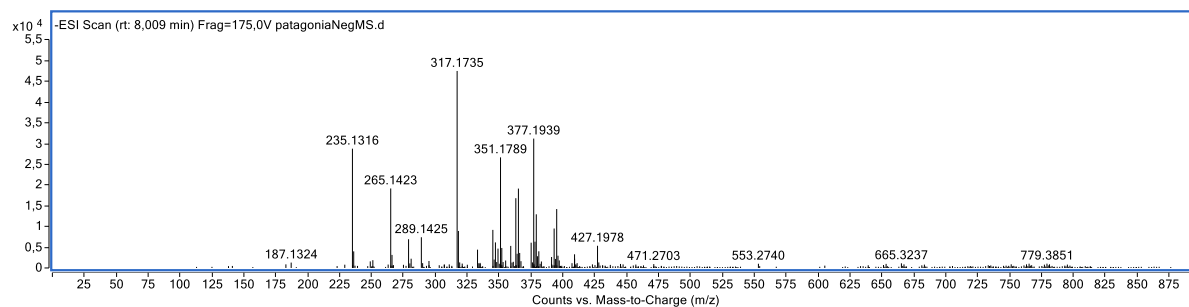


Figura S31. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 317,1735 da amostra de cerveja BS2.

(A)



(B)

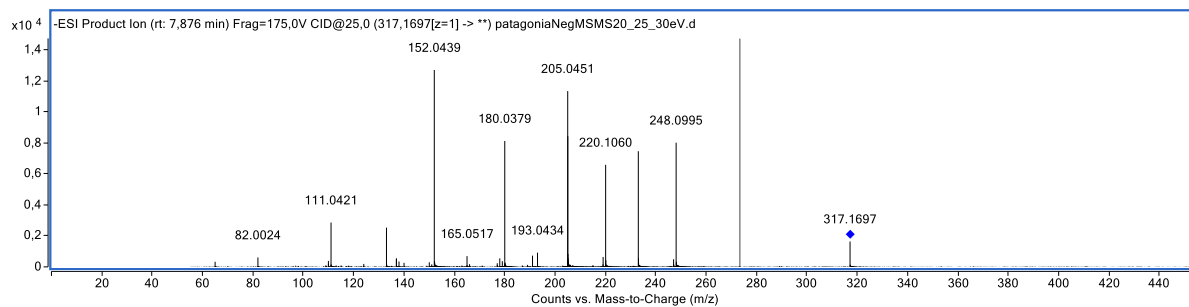
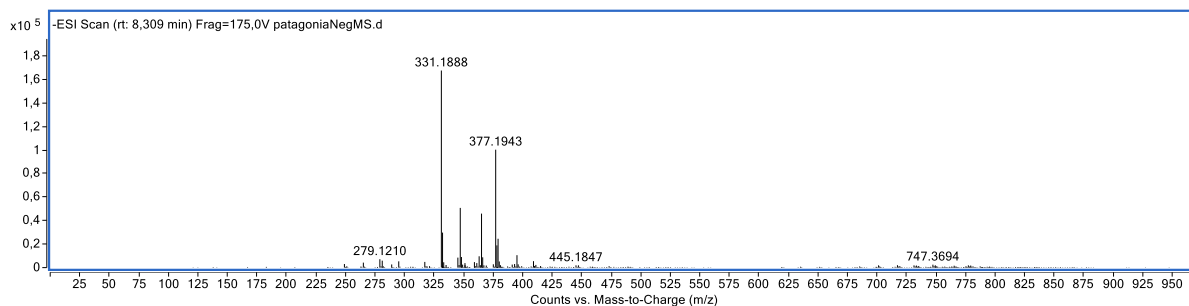
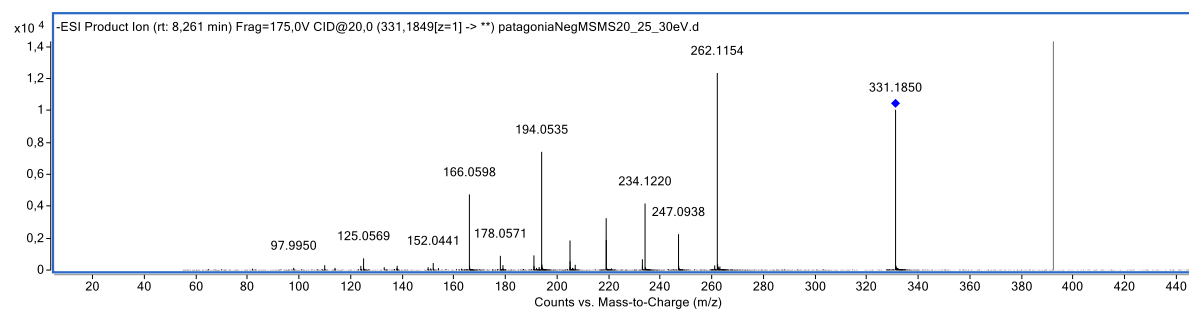


Figura S32. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 331,1888 da amostra de cerveja BS2.

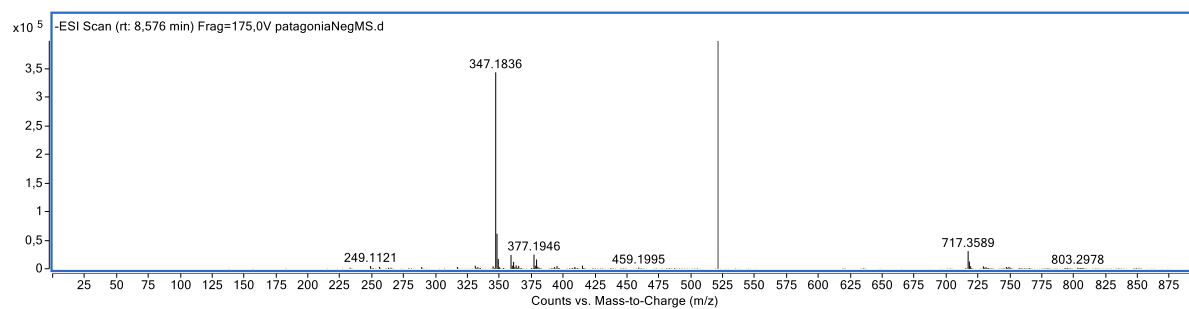
(A)



(B)

Figura S33. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 347,1836 da amostra de cerveja BS2.

(A)



(B)

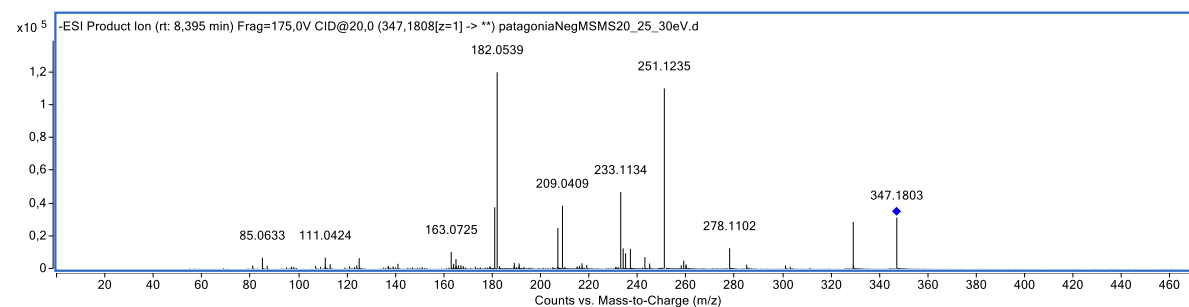
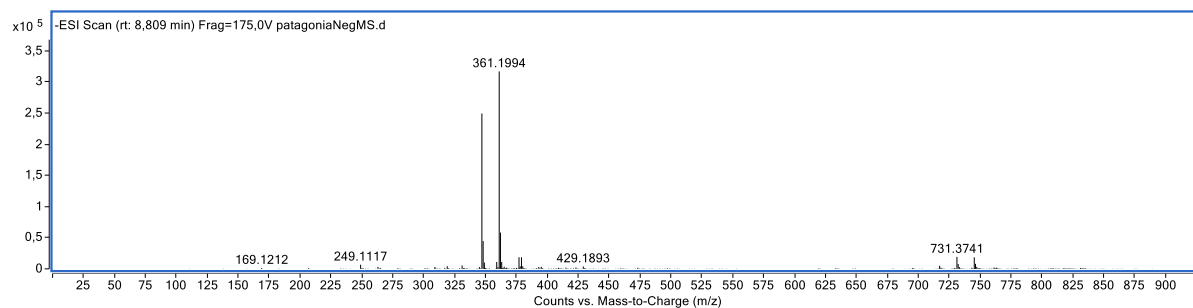


Figura S34. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 361,1994 da amostra de cerveja BS2.

(A)



(B)

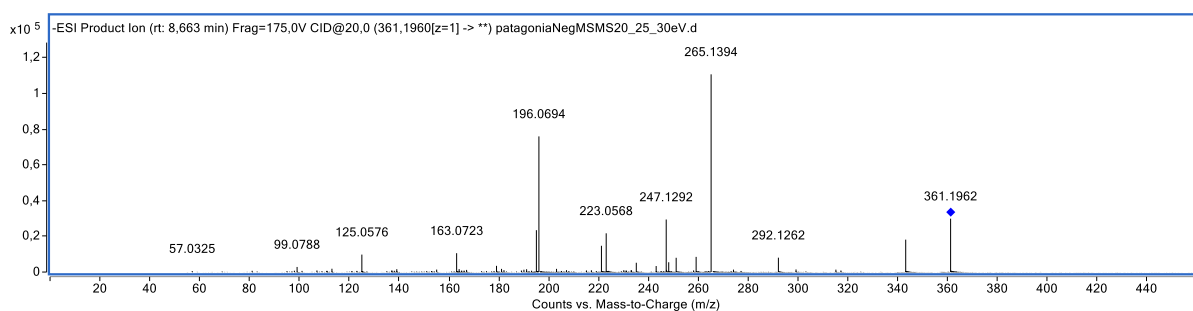


Figura S35. Cromatograma do extrato de isoctano da amostra de cerveja BS3 em modo negativo.

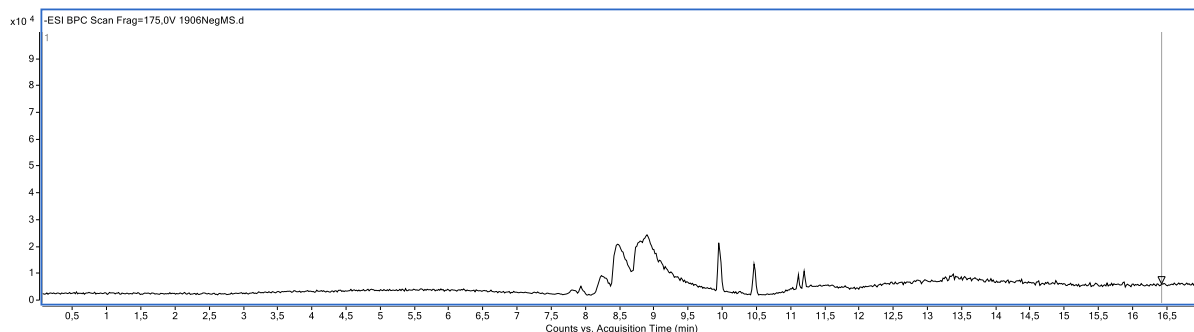
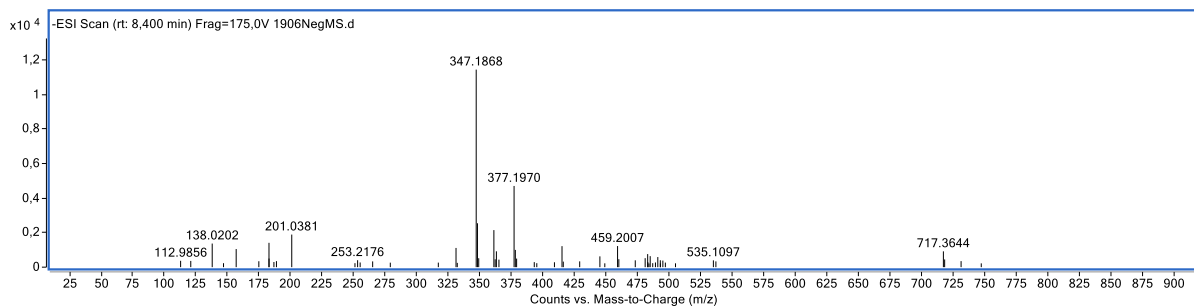


Figura S36. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 347,1868 da amostra de cerveja BS3.

(A)



(B)

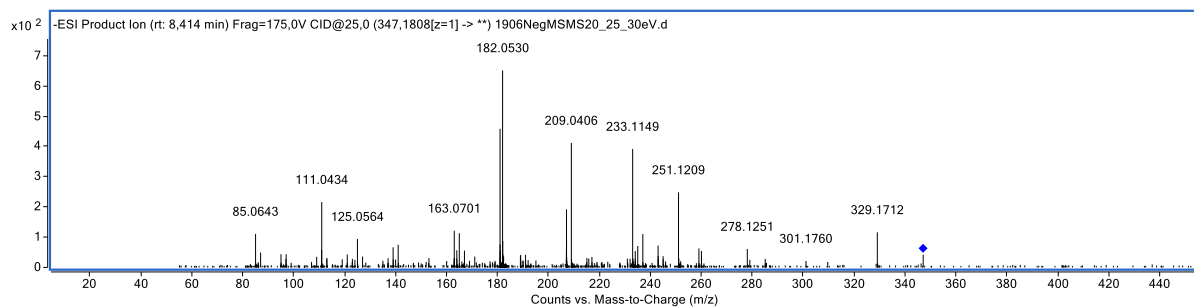
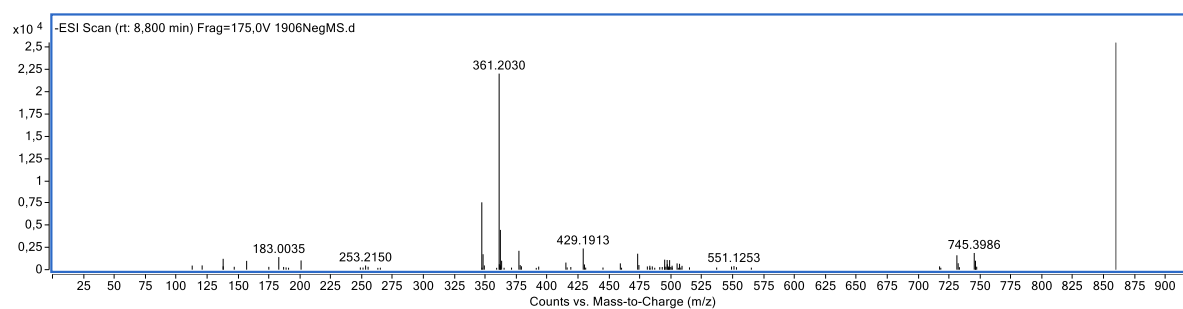


Figura S37. (-) ESI –EM (A) e (-) ESI EM/EM (B) de m/z 361,2030 da amostra de cerveja BS3.

(A)



(B)

