

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**LAIZA LEAL SIQUARA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE LÚPULOS  
CULTIVADOS NO BRASIL**

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2020**

**LAIZA LEAL SIQUARA**

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE LÚPULOS  
CULTIVADOS NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Alexandre Fontes Pereira

Coorientadora: Patrícia Fontes Pinheiro

**VIÇOSA – MINAS GERAIS  
2020**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da  
Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Siquara, Laiza Leal, 1994-  
S618c                    Caracterização química de constituintes voláteis de lúpulos  
2020                    cultivados no Brasil / Laiza Leal Siquara. - Viçosa, MG, 2020.  
64 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Alexandre Fontes Pereira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.51-55.

1. *Humulus Lupulus*. 2. Extração (Química). 3. Mantiqueira, Serra da (MG-SP). I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.  
II. Título.

CDD 22 ed. 660.2842

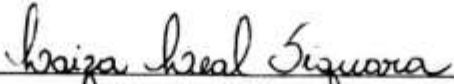
**LAIZA LEAL SIQUARA**

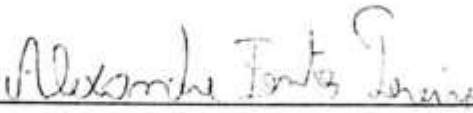
**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE LÚPULOS  
CULTIVADOS NO BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 29 de maio de 2020.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Laiza Leal Siquara  
Autora

  
\_\_\_\_\_  
Alexandre Fontes Pereira  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me tornar capaz de chegar até aqui. Aos meus pais, Zita e Marcos, e minha irmã Aida por estarem sempre ao meu lado, me mandando palavras de conforto quando mais precisei. As minhas amigas Lorena e Anna Luísa, pela parceria e amizade formada desde o princípio e que levarei para o resto da vida; Flávia pela amizade, companheirismo e paciência que sempre teve comigo; Iara por ter me acolhido maravilhosamente bem em Viçosa e não ter medido esforços para me ajudar. Ao meu orientador Alexandre que sempre me acalmou nos momentos de desesperos. A minha coorientadora Patrícia, extremamente solícita, que me ensinou que com competência e fé chegamos aonde a gente quiser. Aos produtores de lúpulo Filipe Monteiro, Rodrigo Veraldi e Paulo Cordeiro (*in memoriam*) que tornaram possível a realização deste trabalho. Aos colegas de laboratório Fábio, Tatiany, Rômulo, Michelle e Kerolay por tornarem o ambiente de trabalho mais leve e divertido. Aos técnicos do DEQ Ricardo, Vandick, Luciana, Patrícia, Abelardo e Aloirta que sempre estiveram muito dispostos a me ajudar. A professora Rita que me ajudou muito durante todo o mestrado, seja com as matérias ou com as papeladas da monitoria. A Camila e a todos do Laboratório Central Analítica de Alegre que me ajudaram quando mais precisei. A professora Carla e a Ana por toda receptividade e paciência que tiveram durante o tempo na UFU. Ao Alex por todo suporte dado em Uberlândia. Ao meu amigo de sempre Vitor Gabriel por ter me ajudado durante a reta final do trabalho. A todos os meus amigos que sempre acreditaram em mim e vibram com todas as minhas vitórias. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## RESUMO

SIQUARA, Laiza Leal, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2020. **Caracterização química de constituintes voláteis de lúpulos cultivados no Brasil** Orientador: Alexandre Fontes Pereira. Coorientadora: Patrícia Fontes Pinheiro.

O lúpulo é um insumo importante para a fabricação de cerveja, contém, dentre outros compostos, óleos essenciais e resinas, responsáveis por conferirem aroma e amargor, respectivamente. O lúpulo é típico de países de clima frio, sendo importado pelas indústrias brasileiras. Começou a ser cultivado no Brasil nos últimos anos, com novas variedades, sendo que a Mantiqueira adaptou-se em diferentes estados do Brasil, necessitando de estudos para identificação de compostos que conferem amargor e aroma às cervejas. O objetivo deste trabalho foi obter extratos de lúpulos brasileiros, da variedade Mantiqueira cultivados nos estados de São Paulo e Minas Gerais e identificar os compostos voláteis extraídos. Foram seguidas metodologias de microextração por fase sólida modo *headspace* (HS-SPME), hidrodestilação (HD) e extração com CO<sub>2</sub> supercrítico (SC) em que foram testadas as pressões de 80 e 110 bar e temperaturas de 40 e 60 °C. Os perfis aromáticos do lúpulo da variedade Mantiqueira cultivados em São Paulo e Minas Gerais (HS-SPME) tiveram como principal característica seu sabor e odor frutado, amadeirado, picante e cítrico. As amostras de São Paulo e Minas Gerais dos lúpulos *in natura* apresentam maiores proporções de hidrocarbonetos sesquiterpenos e hidrocarbonetos monoterpenos. O β-mirceno foi o composto de maior concentração nas duas variedades no lúpulo *in natura*, entretanto nas extrações com CO<sub>2</sub> supercrítico e na hidrodestilação ele foi identificado em menores proporções, por ser um composto muito sensível a oxidação e muito volátil. O composto cis-β-farneseno que é predominante no lúpulo cultivado em São Paulo e em Minas Gerais, só foi identificado na hidrodestilação. Cada metodologia de extração revelou um perfil de compostos voláteis diferentes. A microextração em fase sólida modo *headspace* ocorreu em menos tempo, utilizou menos amostra e identificou muitos compostos. Entretanto, é uma técnica empregada apenas para identificação de compostos, e não para produzir extratos comerciais. A hidrodestilação apresentou-se como uma metodologia pouco aplicável, por apresentar um rendimento muito inferior ao esperado. Por outro lado, os perfis de voláteis indicaram semelhanças consideráveis com os perfis dos lúpulos *in natura*. A condição de extração supercrítica, 110 bar e 40 °C foi a que apresentou maiores rendimentos. Extratos hidrodestilados proporcionam notas amadeiradas, picantes, cítricas e frutadas. Enquanto extratos obtidos por extração supercrítica

são predominantemente frutados, florais, mentolados e picantes. Logo, a variedade Mantiqueira tem aplicação comercial podendo ser utilizada, tanto em sua forma natural, quanto em forma de extratos, nas etapas de fabricação da cerveja para conferir atributos sensoriais ao produto.

**Palavras-chave:** *Humulus Lupulus*. Mantiqueira. HS-SPME. Hidrodestilação. Extração Supercrítica. GC-MS.

## ABSTRACT

SIQUARA, Laiza Leal, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2020. **Chemical characterization of volatile constituents of hops grown in Brazil.** Adviser: Alexandre Fontes Pereira. Co-adviser: Patrícia Fontes Pinheiro.

Hops are a raw material of great importance for the manufacture of beer. Containing, among other compounds, essential oils and resins, responsible for beer aroma and bitterness, respectively. Typically a cold country product, in recent years hops started also to be produced in Brazil, with new varieties, Mantiqueira has well adapted in different states, opening the way for studies and analysis of this product. The main goal of this work was to obtain Mantiqueira's Brazilian hops extracts, grown in the states of São Paulo and Minas Gerais and to identify the extracted volatile compounds. The Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME), hydrodistillation and supercritical CO<sub>2</sub> extraction methodologies were followed, on the latest pressures of 80 and 110 bars and temperatures of 40 and 60 °C were tested. Mantiqueira hops have shown a fruity, woody, spicy and citric aromatic profile. Samples from São Paulo and Minas Gerais had higher proportions of sesquiterpene hydrocarbons and monoterpene hydrocarbons.  $\beta$ -myrcene was the compound with the highest concentration in both varieties of fresh hops, however in extractions with supercritical CO<sub>2</sub> and in hydrodistillation this compound was identified in smaller proportions, since it is very sensitive to oxidation and very volatile. Cis- $\beta$ -farnesene, compound predominant in hops cultivated in São Paulo and Minas Gerais, it could be only identified in hydrodistillation. The headspace solid phase microextraction occurred in less time, used less sample and identified many compounds. However, HS-SPME is a technique used only to identify compounds, and not to produce commercial extracts. Hydrodistillation methodology was not considered very applicable, as it presents a much lower yield than expected, on the other hand, its volatile profiles indicated considerable similarities with the hops profiles in natura. The condition of supercritical extraction, 110 bar and 40 °C was the one with the highest yields. Hydrodistilled extracts provide woody, spicy, citric and fruity notes. While extracts obtained by supercritical extraction are predominantly fruity, floral, menthol and spicy. Therefore, Brazilian Mantiqueira was found to have commercial applicability and could be used, both in its natural form and in the form of extracts, for brewing to confer sensory attributes to the product.

**Keywords:** *Humulus Lupulus*. Mantiqueira. HS-SPME. Hydrodistillation. Supercritical Extraction. GC-MS.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Classificação e nomenclatura das resinas do lúpulo.....	16
<b>Figura 2-</b> Esquema da metodologia aplicada.....	23
<b>Figura 3-</b> Esquema do equipamento utilizado na extração com CO <sub>2</sub> supercrítico. ....	26
<b>Figura 4-</b> Principais componentes do perfil aromático dos lúpulos Mantiqueira in natura.....	30
<b>Figura 5-</b> Curvas cinéticas experimentais de extração do lúpulo Mantiqueira cultivado em São Paulo para diferentes condições de extração. ....	37
<b>Figura 6-</b> Curvas cinéticas experimentais de extração do lúpulo Mantiqueira cultivado em Minas Gerais para diferentes condições de extração. ....	39
<b>Figura 7-</b> Gráficos de radar dos perfis voláteis obtidos por HS-SPME, HD e SC de lúpulos Mantiqueira de São Paulo e Minas Gerais.....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Principais produtores de lúpulo, produção em toneladas no ano de 2018.Principais produtores de lúpulo, produção em toneladas no ano de 2018.....	13
<b>Tabela 2-</b> Áreas dos picos identificados no GC-MS dividida pela área total dos picos detectados. Para HS-SPME e HD.....	29
<b>Tabela 3-</b> Porcentagens das áreas dos picos dos compostos identificados nos cromatogramas separados em grupos. Para amostras de HS-SPME.....	32
<b>Tabela 4-</b> Massa de lúpulo, massa do óleo e rendimento obtidos nas hidrodestilações.....	33
<b>Tabela 5-</b> Médias da duplicata das áreas dos principais picos identificados nos cromatogramas gerados após análise em GC-MS dos óleos.....	34
<b>Tabela 6-</b> Porcentagens das áreas dos picos dos compostos identificados nos cromatogramas separados em grupos. Para amostras de HD.....	35
<b>Tabela 7-</b> Condições experimentais e rendimentos obtidos na extração de lúpulo Mantiqueira cultivado em São Paulo com CO2 supercrítico.....	36
<b>Tabela 8-</b> Condições experimentais e rendimentos obtidos na extração de lúpulo Mantiqueira cultivado em Minas Gerais com CO2 supercrítico.....	38
<b>Tabela 9-</b> Áreas dos picos identificados no GC-MS dividida pela área total dos picos detectados. Para SC-SP.....	41
<b>Tabela 10-</b> Áreas dos picos identificados no GC-MS dividida pela área total dos picos detectados. Para SC-MG.....	42
<b>Tabela 11-</b> Porcentagens das áreas dos picos dos compostos identificados nos cromatogramas separados em grupos. Para amostras de SC.....	44

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>12</b>
2.1 Lúpulo .....	12
2.1.1 Produção mundial e nacional .....	12
2.1.2 Morfologia, adaptação e colheita .....	14
2.1.3 Lupulina .....	14
2.1.4 Composição química.....	15
2.1.4.1 Óleos essenciais .....	15
2.1.4.2 Resinas .....	16
2.1.4.3 Polifenóis.....	17
2.2 Formas comerciais do lúpulo para indústria cervejeira.....	18
2.2.1 <i>In natura</i> .....	18
2.2.2 <i>Pellets</i> .....	19
2.2.3 Extratos .....	20
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>22</b>
3.1 Matérias-primas.....	23
3.2 Microextração em fase Sólida modo <i>headspace</i> (HS-SPME) .....	24
3.2.1 Caracterização por GC-MS .....	24
3.3 Extração por hidrodestilação (HD) .....	25
3.3.1 Caracterização por GC-MS .....	25
3.4 Extração supercrítica utilizando CO <sub>2</sub> (SC).....	26
3.4.1 Caracterização por GC-MS .....	27
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>27</b>
4.1 Microextração em fase sólida modo <i>headspace</i> .....	27
4.2 Extração por hidrodestilação .....	32
4.3 Extração com CO <sub>2</sub> supercrítico .....	35
4.4 Diferenças entre perfis voláteis obtidos por HS-SPME, HD e SC.....	45
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>56</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção de cerveja no Brasil apresentou uma tendência crescente nos últimos 30 anos. Em 2008 existiam menos de 100 cervejarias registradas. Esse número cresceu e até 2019 foram registradas 1.209 unidades produtoras cuja os produtos somam aproximadamente 27.329 registros (MAPA, 2020), evidenciando a tendência do setor em diversificar seus produtos. Em 2018 a produção mundial de cerveja atingiu 1,90 bilhões de hectolitros, sendo o Brasil responsável pela produção de 141 milhões de hectolitros. O país é o terceiro maior produtor mundial de cerveja, atrás apenas da China (381 milhões de hectolitros) e dos EUA (214 milhões de hectolitros) (BARTH-HAAS GROUP, 2019).

De acordo com a Legislação Brasileira (DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009), art. 36, “cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”. Seu sabor é o resultado da combinação da escolha da matéria-prima, levedura, do tipo de processamento bem como de compostos produzidos durante a fermentação e maturação (VENTURINI FILHO, 2016). Especificamente, cerveja especial, cerveja artesanal, cerveja gourmet, são termos amplamente utilizados, mas que não são definidas na constituição brasileira (MULLER; MARCUSSO, 2017). De modo geral, esses são os nomes dados às cervejas produzidas a partir de matérias-primas superiores, processadas de modo a enaltecer a qualidade final do produto (CERVIERI JÚNIOR, et al., 2014).

As cervejarias artesanais consistem em um mercado de nicho em ascensão no Brasil. Os consumidores desse mercado prezam por variedades de características e sensações que incluem, dentre outros atributos, teores mais elevados de lúpulo, sabor marcante de malte, cores e espuma diferenciadas, frescor e presença de ingredientes especiais. Todas essas características abrem espaço mercadológico para a criação de diferentes estilos da bebida como as cervejas Lager, Pilsen, Ale, Stout dentre outras (STRONG; ENGLAND, 2015).

Em se tratando do lúpulo, o seu sabor característico é essencial para o impacto organoléptico total da cerveja. Os seus componentes acrescentam ao produto características sensoriais como amargor e aroma (GARCIA; CHAGAS, 2018). Este ingrediente também é responsável pela estabilidade do sabor, conservação da bebida (uma vez que são bactericidas naturais) e pela retenção da espuma (DRAGONE et al., 2007). Para fabricação de cerveja utilizam-se apenas flores femininas do lúpulo, pois são estas que contém a substância lupulina. Podem ser comercializados na forma de extrato, flores prensadas e na forma de *pellets* (pequenas pelotas de flores prensadas) (RODRIGUES et al., 2015).

Para evitar a degradação ou evaporação dos compostos responsáveis pelo amargor e aroma, durante o armazenamento e o processamento, uma alternativa é a utilização de extratos de lúpulo obtidos por meio de hidrodestilação e extração supercrítica com dióxido de carbono. Fazendo-se o uso de extratos, muitos problemas industriais são resolvidos como economia de energia devido à falta de necessidade de manter o lúpulo refrigerado, facilidade de armazenamento e garantia da homogeneidade do produto (ZEKOVIC et al., 2014).

Até então todo o suprimento de lúpulo do Brasil é importado da Europa e Estados Unidos, o que implica em um aumento do seu custo de compra e conseqüentemente do custo da produção da cerveja. A ideia de que o país não apresenta as condições climáticas favoráveis ao cultivo do lúpulo perdurou por muito. Entretanto, mediante manejo adequado, considerando clima, solo e incidência solar nas diferentes regiões do Brasil, hoje o lúpulo é cultivado em pequena escala em alguns estados da região sul e sudeste do país (GARCIA; CHAGAS, 2018).

Neste sentido, torna-se necessário o estudo sobre essas espécies brasileiras bem como o desenvolvimento de produtos derivados a serem utilizados no processo cervejeiro. O extrato de lúpulo brasileiro surge como uma proposta que, juntamente com outros insumos nacionais, pode ser utilizado para fabricação de cervejas genuinamente brasileiras. Além disso, beneficia, em especial, os pequenos produtores de cervejas, produzidas artesanalmente, tanto no preço (atualmente as microcervejarias pagam muito caro pelo lúpulo importado que é usado em pequenas quantidades), quanto na qualidade visto que a utilização de extratos de lúpulo propicia um padrão de qualidade do produto fabricado.

Este trabalho teve por objetivo obter extratos de variedades de lúpulo (Mantiqueira BRK 2014) cultivadas nos Estados de Minas Gerais e São Paulo por meio de microextração em fase sólida modo *headspace*, hidrodestilação e extração com CO<sub>2</sub> supercrítico e caracterizar por técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. De modo específico teve-se por objetivos: extrair óleos essenciais mediante metodologias estabelecidas; caracterizar os extratos obtidos (hidrodestilação e extração supercrítica) bem como os lúpulos *in natura* (microextração em fase sólida); verificar a eficiência das extrações mediante comparação dos rendimentos dos extratos; identificar semelhanças e/ou diferenças no perfil aromático de lúpulos Mantiqueira cultivados em São Paulo e Minas Gerais e verificar a melhor condição de operação de extração supercrítica (pressão e temperatura do CO<sub>2</sub>) mediante comparação com o perfil aromático do lúpulo *in natura*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Lúpulo

A utilização das várias partes da planta do lúpulo é uma prática antiga e que perdura até a atualidade. Há relatos da utilização do lúpulo desde a época do Império Grego, onde a folha era consumida em saladas em alguns países europeus. Esta planta também ficou conhecida pelo seu “potencial de cura” de uma ampla gama de doenças sendo associado o seu uso à liberação de impurezas, redução de tumores, flatulências e cocceiras (WANG et al., 2014).

Atualmente, o lúpulo é utilizado para diversos fins como para inibição de crescimento microbiano e fabricação de extratos para melhoramento de cabelo. Porém o seu principal uso baseia-se na fabricação de cerveja (WANG et al., 2014). Não existem comprovações da utilização do lúpulo nas cervejas produzida antes do século VIII d.C. Certamente fazia-se seu uso, mas, o primeiro registro histórico comprobatório é proveniente do século seguinte, de um registro documentado por um mosteiro (MEUSSDOERFFER, 2009).

A colheita de lúpulo tornou-se importante no norte da Alemanha durante o século XIV expandindo demasiadamente a venda de cervejas lupuladas nessa região. Na Inglaterra o lúpulo foi introduzido no final do século XV. O crescimento do comércio do lúpulo na América do Norte começou em 1629 e entre 1859 e 1869 o cultivo desta planta foi iniciado na costa do Pacífico, tornando a região a principal produtora de lúpulo dos Estados Unidos em 1909 (MEUSSDOERFFER, 2009). No Brasil, o cultivo de lúpulo é recente e encontra-se em expansão nas regiões sul e sudeste do país.

#### 2.1.1 Produção mundial e nacional

Segundo dados estatísticos da FAO (*Food and Agriculture Organization*) (2018), a maior produtora mundial de lúpulo são os Estados Unidos, seguidos pela Etiópia e Alemanha (Tabela 1). Juntos, os três países são responsáveis por 80,21% da produção mundial do lúpulo. Apesar de maior produtor, os Estados Unidos são o segundo maior exportador de lúpulo (11.541 toneladas/ano) sendo a Alemanha a primeira colocada nesse *ranking* (25.368 toneladas/ano). O valor bruto da produção mundial de lúpulo dos 20 maiores exportadores no ano de 2017 foi de US\$ 603,328 milhões (FAO, 2018).

**Tabela 1-** Principais produtores de lúpulo, produção em toneladas no ano de 2018. Principais produtores de lúpulo, produção em toneladas no ano de 2018.

Fonte: FAO (2018).

<b>País</b>	<b>Produção (t)</b>	<b>Porcentagem (%)</b>
Estados Unidos	48.492	32,65
Etiópia	38.111	25,66
Alemanha	32.527	21,90
China	8.407	5,66
República Tcheca	5.126	3,45
Eslovênia	3.078	2,07
Coréia do Norte	2.031	1,37
Albânia	1.937	1,30
Polônia	1.746	1,18
Espanha	915	0,62
Outros países*	6.136	4,13
<b>Total</b>	<b>148.506</b>	<b>100,00</b>

Outros países\*: inclui a produção dos outros 10 maiores produtores de lúpulo no *ranking* dos 20 maiores.

Atualmente existe no Brasil uma incipiente produção de lúpulo. A planta brasileira envolve uma diversificada cadeia produtiva, do plantio à pesquisa, uma vez que há a necessidade de se desenvolver um manejo específico, em relação ao cultivo da planta por existem dificuldades de adaptação em climas tropicais sendo até então considerado um produto típico de países frios (GARCIA; CHAGAS, 2018).

Com a produção voltada para as microcervejarias, concentrando-se nos estados de Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, produtores rurais trabalham com diversas variedades já conhecidas, como Magnum, Hallertau, Columbus, Cascade, Chinook, e Zeus e algumas oriundas do cruzamento e melhoramento genético (GARCIA; CHAGAR, 2018).

Magnum e Hallertau são variedades nativas da Europa. Chinook, Cascade, Columbus e Zeus são provenientes dos Estados Unidos. A variedade Magnum proporciona à cerveja amargor equilibrado e notas florais leves e frutadas. Hallertau é considerado uma variedade aromática responsável por atribuir notas florais, ligeiramente cítricas. Columbus é um lúpulo picante, aromático e muito usado para fornecer amargor às Bitter Ales e às IPA's americanas (HIERONYMUS, 2012).

A variedade Cascade também contribui para aroma floral e cítrico além de possuir potencial de amargor equilibrado. Chinook possui notas amadeiradas e de especiarias. Também contribui para o amargor. Zeus é um lúpulo aromático com notas terras, cítricas e picantes (HIERONYMUS, 2012). Dentre as espécies provenientes da modificação genética de outras variedades, tem-se o lúpulo Mantiqueira. Este foi obtido de sementes que se adaptaram ao solo e às condições climáticas do Brasil (GARCIA; CHAGAR, 2018). Suas características ainda não foram reportadas pela literatura.

A produção nacional de lúpulo é de suma importância para a crescente indústria de cervejas do país. Esse insumo nacional chega aos pequenos produtores a menor custo possibilitando a produção de cervejas com menor preço e de melhor qualidade (GARCIA; CHAGAR, 2018).

### **2.1.2 Morfologia, adaptação e colheita**

A espécie *Humulus lupulus* é uma planta trepadeira perene de aproximadamente 5 a 7 metros de altura, com idade econômica de cultivo superior a 20 anos, da família Cannabaceae, em que ambos os sexos estão em plantas diferentes (dióica). Só as plantas do sexo feminino são utilizadas no processo cervejeiro, uma vez que somente seus cones de lúpulo (flor do lúpulo) conseguem segregar lupulina, a partir das glândulas de lupulina - parte mais importante do lúpulo na produção da cerveja (ALMAGUER et al., 2014).

O melhor desenvolvimento destas plantas ocorre entre as latitudes 30° e 52°, sob temperatura média anual próxima de 8 a 10° C. A insolação deve ter duração em torno de 15 horas por dia. Esta planta cresce em uma variedade de solos, porém, é preferível solos profundos, férteis, arejados e com pH entre 6 e 7,5. Possivelmente, rendimentos menores serão encontrados em regiões com características diferentes destas (HIERONYMUS, 2012).

A colheita do lúpulo é feita no final do verão quando os cones estão maduros. Estes são cortados, colhidos e submetidos a uma secagem em estufas para retirar a umidade existente e para evitar o crescimento de microrganismos, aumentando seu tempo de conservação. O lúpulo pode ser embalado a vácuo, mantido a temperaturas baixas e protegido da luz, de forma a evitar a oxidação de alguns compostos (PRIEST; STEWART, 2006).

### **2.1.3 Lupulina**

Lupulina consiste em um pó amarelo pegajoso e aromático produzido pelas glândulas de lupulina presentes no interior dos cones de lúpulo feminino. As glândulas de lupulina são ricas em resinas, óleos essenciais e polifenóis. Estas desenvolvem-se na base das brácteas (pétalas internas). Devido ao seu alto teor de óleos essenciais e resinas (brandas – *soft resins* e

duras – *hard resins*), a lupulina é o composto que, de fato, interessa os produtores de cerveja (HIERONYMUS, 2012).

#### **2.1.4 Composição química**

Para a indústria cervejeira, os compostos de interesse do lúpulo são os que conferem aroma e amargor à bebida. Mais de mil compostos foram identificados destacando-se os óleos essenciais (que conferem aroma), que em sua maioria são hidrocarbonetos, cetonas, aldeídos, ésteres, ácidos carboxílicos, álcoois e compostos sulfurosos e oxigenados. De acordo com o teor de alfa-ácidos (que confere amargor) os lúpulos são diferenciados em duas categorias: lúpulos aromáticos que possuem de 3,8 a 5,1% de alfa-ácidos e lúpulos de amargor que possuem entre 8,6 e 12,9% de alfa-ácidos em sua composição (LERMUSIEAU et al., 2002).

Um cone de lúpulo seco contém 8 a 10% de umidade, 40 a 50% de celulose, até 15% de proteína, de 8 a 10% de cinza, 2% de pectina, até 5% de lipídeos, 2 a 5% de polifenóis, 0 a 10% de alfa-ácidos e 0,5 a 4% de óleos essenciais (HIERONYMUS, 2012). Os teores exatos de cada composto dependem da variedade, origem, tempo de colheita, condições de cultivo e de armazenamento e a forma de secagem do lúpulo. Uma vez que lipídeos, proteínas e celulose são insolúveis, óleos essenciais, polifenóis e resinas são as substâncias que contribuem com o processo cervejeiro (VENTURINI FILHO, 2016).

##### **2.1.4.1 Óleos essenciais**

Os óleos essenciais são compostos químicos voláteis responsáveis por conferir à cerveja o seu perfil aromático com notas cítricas, amadeiradas, picantes e frutadas. Os principais grupos que compõe os óleos essenciais são: compostos sulfurosos (1%), hidrocarbonetos (50 a 80%) e os compostos oxigenados (20 a 50%). Dentre os compostos que contêm enxofre cita-se os tioésteres e sulfetos (DMS – dimetilsulfeto). Quanto aos hidrocarbonetos dividem-se em terpenos e hidrocarbonetos alifáticos (SCHÖNBERGER; KOSTELECKY, 2011).

Já os compostos oxigenados subdividem-se em terpenos oxigenados (álcoois monoterpênicos, sesquiterpênicos, diterpênicos) e compostos variados (ésteres, cetonas entre outros). Estudos apontam os álcoois monoterpênicos como bons contribuintes para o aroma na cerveja. Dentre esses álcoois, destacam-se o linalol, geraniol, nerol,  $\alpha$ -terpineol e o  $\beta$ -citronelol (TAKOI et al., 2010).

Os hidrocarbonetos são altamente voláteis, pouco solúveis e são perceptíveis na cerveja acabada apenas quando adicionados ao final da fervura ou pós-fermentação. Os compostos oxigenados são mais solúveis e aromáticos. Seus aromas, que podem ser resultantes de oxidações de compostos durante o processo de fermentação, têm maior probabilidade de aparecer na cerveja acabada. Os compostos de enxofre representam uma pequena porção dos

óleos, podendo influenciar positiva ou negativamente o aroma da cerveja acabada (HIERONYMUS, 2012).

Os componentes mais reportados nos perfis das variedades são mirceno, cariofileno, humuleno e farneseno. O primeiro é um monoterpene, ou seja, possui 10 unidades de carbono, enquanto os outros são sesquiterpenos (15 unidades de carbono). O mirceno possui aroma herbáceo e resinoso que pode ou não ser desejável. Constitui frequentemente 50% ou mais dos óleos das cultivares americanas, e é volátil sendo a maior parte do seu aroma perdida durante a fervura. Na sua forma oxigenada, os sesquiterpenos têm mais probabilidade do que o mirceno de estarem presentes na cerveja acabada, seus aromas resultantes são geralmente descritos como finos ou nobres (HIERONYMUS, 2012). A complexidade do aroma do lúpulo tem sido objeto de muitos estudos, principalmente relacionando o seu óleo essencial à produção de cerveja, uma vez que este é usado principalmente para este fim (EYRES; DUFOUR, 2009).

#### 2.1.4.2 Resinas

A classificação das resinas do lúpulo é baseada na solubilidade destas em solventes orgânicos. Na Figura 1 é apresentado um esquema da composição e nomenclatura destas resinas:



**Figura 1-** Classificação e nomenclatura das resinas do lúpulo.

**Fonte:** PALAMAND; ALDENHOFF (1970), adaptado pelo autor.

As resinas duras constituem em um grupo de compostos mais polares, comparadas com as resinas brandas, sendo insolúveis em hexano e solúveis em éter. Conferem amargor bruto e contribuem para a estabilidade da espuma da cerveja (PRIEST; STEWART, 2006). Aceita-se que estas resinas são, em sua maioria, produtos da oxidação das resinas brandas que ocorre durante armazenamento dos cones de lúpulo (OLSOVSKA et al., 2016).

As resinas brandas são caracterizadas por serem solúveis em hexano e são compostas pelos  $\alpha$  e  $\beta$  ácidos. Os  $\alpha$ -ácidos (humulonas) representam um grupo de floroglucínóis

(benzenotriol) substituídos com um radical acila. Vários análogos de ácidos são conhecidos, sendo diferenciados pela cadeia lateral acila, são eles o n-humulona, co-humulona, ad-humulona, pos-humulona, pre-humulona, adpre-humulona (BRIGGS et al., 2000).

A natureza muito reativa de um ácido torna-o suscetível a reagir quimicamente quando submetido à influência de calor, luz, mudança de pH, condições de oxidação e redução. Uma das principais reações que ocorre com os  $\alpha$ -ácidos é a isomerização induzida pelo calor, durante a etapa de ebulição do mosto, transformando-os em iso- $\alpha$ -ácidos. Essa reação produz uma mistura de dois estereoisômeros: cis-isohumulona e trans-isohumulona (VERZELE et al., 1965).

Os  $\alpha$ -ácidos são caracterizados por conferirem um sabor amargo à cerveja e são um dos compostos mais importantes das resinas de lúpulo para a indústria cervejeira. A reação de isomerização, que ocorre durante a adição do lúpulo na etapa de fervura da cerveja, confere à cerveja sabor ainda mais amargo visto que os iso- $\alpha$ -ácidos possui este potencial. Aproximadamente 80% do amargor da cerveja é proveniente destes compostos (CABALLERO et al., 2012). Além disso iso- $\alpha$ -ácidos são mais solúveis e também estão relacionados com a estabilização da espuma (ALMAGUER et al., 2014).

Os  $\beta$ -ácidos (lupulonas), por sua vez, também são precursores do gosto amargo da cerveja, porém, de uma forma mais grosseira, devido à sua baixa solubilidade no mosto. Apresentam-se também nas formas co, ad, pre e pos por substituição do radical acila na sua estrutura química (STEENACKERS; COOMAN; VOS, 2015).

O grupo fenil, presente nas cadeias laterais dos  $\beta$ -ácidos, interfere no transporte de metabólitos na membrana celular e altera o pH intracelular provocando a morte de bactérias gram-positivas (KEUKELEIRE, 2000). Esta atividade bactericida dos  $\beta$ -ácidos contribui para a qualidade da cerveja uma vez que elimina microrganismos durante a estocagem da referida bebida (STEENACKERS; COOMAN; VOS, 2015).

#### **2.1.4.3 Polifenóis**

Polifenóis são compostos orgânicos do lúpulo, que contêm mais de um grupo hidroxila fenólica. A presença de polifenóis na cerveja altera suas características sensoriais e nutricionais, tornando-a, por exemplo, uma fonte de antioxidantes. Desta forma, seu consumo moderado pode contribuir para a prevenção de algumas doenças que envolvem a participação de radicais livres como câncer, por exemplo (PRIEST; STEWART, 2006). Estudos também mostraram que extratos brutos de polifenóis do lúpulo apresentam atividade antibacteriana (YAHIRO et al., 2005) e anti-inflamatória (BECKER et al., 2009).

A maior parte destes compostos encontra-se nas pétalas do lúpulo, com exceção dos prenilflavonóides que estão presentes na lupulina (PRIEST; STEWART, 2006). Mais de 80% dos polifenóis consistem em compostos de alto peso molecular como agentes tanantes e taninos (ácidos tânicos), que conferem adstringência à cerveja. Alguns polifenóis de baixo peso molecular interagem quimicamente com proteínas o que diminui a formação de suspensões turvas, conferindo estabilidade a cerveja (OSLOVSKA, 2016). Ademais, a característica antioxidante dos polifenóis evita a oxidação da bebida (HIERONYMUS, 2012).

O grupo mais importante de polifenóis consiste em prenilflavonóides (calconas preniladas). O xanthohumol é o principal composto do grupo. Devido às suas propriedades anti-inflamatórias, anti-estrogênicas e à sua capacidade de controlar a proliferação de células cancerígena, o composto tornou-se de grande interesse não somente da indústria cervejeira como também da farmacêutica e de alimentos, de modo geral (PRIEST; STEWART, 2006). De acordo com pesquisas de Karabín e colaboradores (2016), cervejas enriquecidas com xanthohumol apresentaram maior vida útil. Para Dresel e colaboradores (2016), a presença desse composto pode conferir aroma e sabor à bebida.

## **2.2 Formas comerciais do lúpulo para indústria cervejeira**

O aroma lupulado da cerveja tem sido apreciado pelos cervejeiros, na medida que favorecem uma melhor qualidade do sabor e do aroma à bebida. Se por um lado os componentes de amargor são fixados em altas temperaturas (a partir de 80° C) necessitando de um tempo para essa fixação, por outro, os compostos aromáticos são voláteis e tendem a evaporar quando expostos a estas temperaturas (OPSTAELE et al., 2012).

Desta forma, os fabricantes de cerveja utilizam técnicas de lupulagem durante a etapa de fervura – para fixação dos iso- $\alpha$ -ácidos- e ainda adicionam o lúpulo durante a maturação (*Dry Hopping*), para fixação dos óleos essenciais (OPSTAELE et al., 2012). O lúpulo pode ser adicionado de diversas formas, direto na tina de fervura, ou com a utilização de *hop bag* de aço inox.

O grande desafio do cervejeiro é justamente mesclar os diversos processos de fixação do amargor com os processos de fixação dos óleos essenciais. Para realização desta lupulagem, está disponível no mercado diferentes formas comerciais do lúpulo sendo as mais usuais sob forma de flores secas (*in natura*), *pellets* (granulado) ou extratos.

### **2.2.1 In natura**

Flores do lúpulo *in natura* consistem na forma mais simples de utilização deste insumo. Para evitar a degradação dos seus componentes durante o processo de fermentação, a secagem

é uma operação que deve ser realizada. O seu grande volume dificulta o transporte, o armazenamento dos cones bem como a manutenção de um padrão de qualidade devido à dificuldade de homogeneização (VENTURINI FILHO, 2016).

Uma alternativa é realizar a prensagem das folhas. Neste processo, o volume de cone de lúpulo é reduzido à metade por meio de processos a alta pressão. Para manter os componentes de interesse, é importante que a prensagem ocorra de maneira a não ocasionar o rompimento das glândulas de lupulina, dificultando a oxidação destes compostos. Os cones são prensados e embalados a vácuo em pacotes chamados “vacupacks” que além de reduzir o volume, também protege os componentes do contato com o oxigênio (HIERONYMUS, 2012).

Os processadores de lúpulo costumam usar o espectrofotômetro UV para medir o Índice de Armazenamento de Lúpulo (HSI – *Hop Storage Index*) e incluem esses valores nos rótulos dos pacotes enviados para cervejarias comerciais. Isso permite que os cervejeiros calculem a velocidade com que os  $\alpha$ -ácidos irão deteriorar-se e ajustar suas receitas à medida que o lúpulo envelhece (HIERONYMUS, 2012).

### **2.2.2 Pellets**

Para produção de lúpulo em *pellets*, inicialmente as folhas do lúpulo são moídas e misturadas para posterior moldagem do pó através de uma placa perfurada. O resultado são *pellets* homogeneizados, de fácil transporte (menor volume) e com níveis consistentes de ácidos, polifenóis e óleos essenciais. Baixas temperaturas de peletização diminuem a perda destes compostos resultando em *pellets* de baixa densidade e de alta qualidade (HIERONYMUS, 2012).

Neste processo, quase todas as glândulas de lupulina são rompidas. Se por um lado, essa característica aumenta de 10 a 15% a eficiência dos *pellets* na fabricação de cerveja, frente ao lúpulo *in natura*, por outro, a falta de proteção da lupulina aumenta de 3 a 5 vezes a velocidade da sua oxidação tornando fundamental o seu correto armazenamento para garantia da sua qualidade (HIERONYMUS, 2012).

Existem dois tipos mais usuais de *pellets*, o Tipo 90 e o Tipo 45. Nos T90, 100% do lúpulo *in natura* é reduzido para, aproximadamente 90%, em virtude das perdas durante o processamento e purificação. Atualmente essas perdas são menores e, conseqüentemente, a porcentagem maior. Os *pellets* Tipo 45 possuem elevado teor de lupulina. O nome T45 indica um duplo enriquecimento dos *pellets* Tipo 90 (VENTURINI FILHO, 2016).

### 2.2.3 Extratos

O lúpulo pode apresentar-se também na forma de extrato, o que permite uma maior redução da massa e volume em comparação ao lúpulo *in natura* e ao lúpulo peletizado, possibilitando uma diminuição dos custos de transporte e armazenamento. Ambos os fatores, juntamente com um aproveitamento eficiente dessa matéria-prima, compensam parte dos custos do seu processamento. A água (hidrodestilação) e vários solventes podem ser utilizados para produzir extratos de lúpulo, mas apenas o dióxido de carbono e o etanol cumprem atualmente os requisitos em termos de segurança, impacto ambiental e custos (VENTURINI FILHO, 2016).

A utilização de extratos de lúpulo frente ao uso de lúpulo na forma de *pellets* ou *in natura* apresenta diversas vantagens como facilidade de manuseio, redução do espaço para armazenamento, aumento da vida útil do produto sem degradação oxidativa, especialmente dos compostos de amargor e sem consumo de energia (lúpulo em *pellets* e *in natura* são mantidos em refrigeradores) (KATONO; YONEZAWA; INUI, 2018).

Os extratos de lúpulo são importantes para a cerveja caso seja desejável sabor e aroma específicos de lúpulo (GUZINSKI; SCHULZE, 1994). Estes podem ser adicionados no início da fervura do mosto, para, principalmente, enaltecer o amargor (LAWS et al., 1980), como podem ser adicionados à cerveja durante a fermentação ou maturação (*Dry Hopping*), com o intuito de acrescentar, principalmente, amoras à bebida (SHARP et al., 2017). Nesses dois casos, o resultado são cervejas sem mudanças de turbidez e de sabores característicos (LAWS et al., 1980).

A técnica do *Dry Hopping*, especificamente, é responsável por uma contribuição significativa na grande expansão do mercado da cerveja artesanal ocorrida nos últimos anos. Este método representa um meio relativamente simples de melhorar o sabor da bebida e quando se utilizam os extratos, a qualidade dos sabores e aromas é mantida (OLADOKUN et al., 2017).

Alguns procedimentos de extração de lúpulo envolvem o uso de solventes orgânicos como cloreto de metileno, dicloroetano, tricloroetileno, etanol, hexano e/ou metanol. Estes solventes dissolvem não apenas os compostos desejados, mas também proporções relativamente altas de  $\beta$ -ácidos, taninos, clorofila e vários outros constituintes do lúpulo. Nestes tipos de extração, para se obter produtos de alta qualidade o extrato bruto deve ser purificado, frequentemente envolvendo outros solventes orgânicos e muitas vezes etapas complexas (KATONO; YONEZAWA; INUI, 2018).

De acordo com o Decreto n° 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, extrato de lúpulo consiste no resultado da extração, por solvente adequado, dos princípios aromáticos ou amargos do lúpulo, isomerizados ou não, reduzidos ou não, devendo o produto final estar isento de solvente.

Os extratos obtidos pela extração com solventes orgânicos normalmente contêm quantidades residuais de solventes. Embora se acredite que estes solventes, particularmente o cloreto de metileno e metanol, são perdidos completamente durante a produção de cerveja quando submetidos a temperaturas mais altas, é um risco aceitar tal preposição como uma verdade, uma vez que se trata de solventes nocivos envolvidos na produção de um gênero alimentício (KATONO; YONEZAWA; INUI, 2018).

Na hidrodestilação, o vapor de água é utilizado para isolar o óleo essencial. Se por um lado a técnica é considerada um método de fácil execução, por outro, deve ser levada em consideração a baixa eficiência de extração devido ao longo tempo de processo e também devido a perdas de componentes sensíveis termicamente e componentes que se dissolvem na água condensada como cetonas e aldeídos (GARDELI et al., 2008).

Apesar das desvantagens apresentadas, alguns países subdesenvolvidos ainda praticam esta técnica, especificamente em lugares onde o gás e a eletricidade são mais baratos. Por outro lado, em escala laboratorial, a hidrodestilação consiste em um método muito reportado na literatura para identificação de compostos (SALANTA et al., 2015).

Segundo Hieronymus (2012), o uso de etanol e água para extração do lúpulo era uma tendência do século XIX. Atualmente, a maioria dos processadores utiliza a extração com dióxido de carbono, seja supercrítico (comum na Europa e nos Estados Unidos) ou líquida (comum na Inglaterra).

O dióxido de carbono é considerado pelas cervejarias como o melhor solvente para a fabricação de extratos de lúpulo. Consiste em um solvente apolar, capaz de dissolver óleos essenciais, não tóxico, não inflamável, não corrosivo, barato e está disponível no mercado em um grau de pureza elevado. Se por um lado os produtos extraídos com CO<sub>2</sub> não possuem traços de solventes tóxicos desagradáveis, por outro, contêm os óleos essenciais presentes no lúpulo e uma alta proporção de  $\alpha$ -ácidos sendo possível o fracionamento destes compostos. Tal característica permite a produção de cervejas com um melhor equilíbrio entre aroma e amargor (KUPSKI et al., 2017).

O CO<sub>2</sub> líquido foi descrito como meio de extração para o lúpulo pela primeira vez na União Soviética, em 1968, por Pekhov e colaboradores. Neste trabalho, o produto foi extraído utilizando-se CO<sub>2</sub> líquido à uma temperatura de 20 a 25° C (LAWS et al., 1980). Sob condições controladas, este solvente é seletivo e não extrai quantidades significativas de compostos secundários (DEREK et al., 1977). A extração com CO<sub>2</sub> em seu estado supercrítico é ainda mais seletivo uma vez que permite maior flexibilidade dos parâmetros do processo e proporcionam melhores taxas de extração que a extração com dióxido de carbono líquido (HIERONYMUS, 2012).

Neste processo, o CO<sub>2</sub> é submetido à pressão e temperatura específicas que o permite obter propriedades de solvente supercrítico para a extração seletiva dos compostos de interesse. Para obtenção da máxima eficiência de extração, ou seja, maior seletividade, as condições de operação (tempo, temperatura, pressão) devem ser modificadas de acordo com os compostos a serem extraídos (DE VOS; MERTENS, 2018).

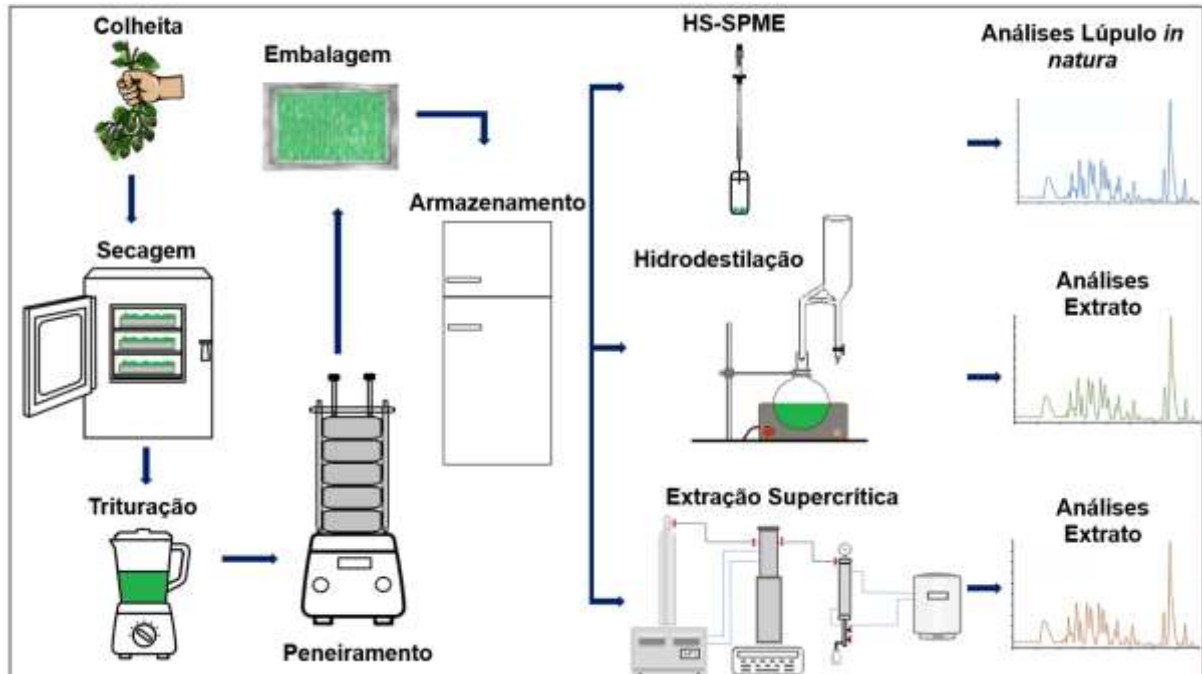
Mesmo que esta técnica não seja ainda plenamente utilizada pela indústria cervejeira, devido ao seu alto custo de instalação, alto custo operacional e exigência de operadores tecnicamente capacitados (MARRIOTT, 2019), as vantagens proporcionadas pelo referido método evidenciam a relevância em estudá-lo e aperfeiçoá-lo.

Produtos refinados de lúpulo, específicos para certas finalidades, são obtidos ao combinar as condições de extração supercrítica com a variedade do lúpulo a ser extraído. Como exemplo destes produtos, cita-se: os extratos aromáticos (óleos essenciais); extratos rho (com di-hidro-iso- $\alpha$ -ácidos, rho que ajuda a prevenir a mudança de sabor quando a cerveja é exposta a luz ultravioleta e proporcionam sabor amargo) e extratos iso (geralmente numa concentração de 30% de iso- $\alpha$ -ácidos, apenas vestígios de  $\beta$ -ácidos e óleos essenciais) (HIERONYMUS, 2012).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Bebidas Fermentadas e Destiladas do Departamento de Química, Laboratório de Processos em Condições Supercríticas e Laboratório Central Analítica, localizados na Universidade Federal de Viçosa, Universidade Federal de Uberlândia e Universidade Federal do Espírito Santo (Campus Alegre), respectivamente.

O resumo da metodologia adotada neste trabalho pode ser verificado na Figura 2 a seguir:



**Figura 2-** Esquema da metodologia aplicada.

**Fonte:** O autor.

### 3.1 Matérias-primas

Foram utilizados lúpulos brasileiros da variedade Mantiqueira BRK 2014 provenientes dos estados de São Paulo (Serra da Mantiqueira) e Minas Gerais (Zona da Mata, cidade Rio Espera), cedidos por produtores locais e colhidos no mês de março de 2019. Ambas as amostras foram submetidas à microextração em fase sólida, modo *headspace* (HS-SPME), extração supercrítica (SC) e hidrodestilação (HD). Os perfis de voláteis gerados por cromatografia gasosa com espectrômetro de massas (GC-MS) dos óleos obtidos (por SC e HD) e do lúpulo *in natura* (por HS-SPME) foram comparados para identificar possíveis diferenças entre os perfis das amostras estudadas (SP e MG).

Inicialmente, as amostras foram secas em estufa (DeLeo) a 40 °C (ZEKOVIC, PFAF-SOVLJANSKI, GRUJIC, 2007) por 24 horas. Posteriormente, estas foram trituradas em liquidificador doméstico e peneiradas em conjunto de peneiras (Bertel Ltda) de *mesh* de 24 a 42 utilizando um agitador eletromagnético (Tamis BT-001) a fim de se obter um produto mais homogêneo (KUPISKI, 2017).

A fração de amostra retida entre peneiras de *mesh* 28 e 35 (aproximadamente 70% do total da amostra) foram submetidas à extração com CO<sub>2</sub> supercrítico (KUPISKI, 2017) e à hidrodestilação. Já as amostras com *mesh* maior ou igual a 42 foram utilizadas na análise dos compostos do lúpulo *in natura* (HS-SPME). Lúpulos moídos e peneirados foram armazenados sob condições recomendadas (-4 °C; sem presença de luz, embalado à vácuo em sacos de

polietileno) para evitar a deterioração dos compostos de interesse para fabricação de cerveja (OPSTAELE et al., 2012).

### 3.2 Microextração em fase Sólida modo *headspace* (HS-SPME)

Para determinação da composição dos óleos essenciais dos lúpulos *in natura*, inicialmente, realizou-se uma microextração por fase sólida modo *headspace*. Para isto, foi utilizado um bastão de fibra óptica de sílica fundida de 0,56 mm de diâmetro externo e com 10 mm de uma de suas extremidades recoberto por polidimetilsiloxano (PDMS) (VALENTE e AUGUSTO, 2000).

Seguindo a metodologia adaptada de Korfta e Nesvadbra (2005), pesou-se, aproximadamente, 0,1 g da amostra de lúpulo de *mesh* maior ou igual a 42 (Tyler) em um frasco *headspace* de 20 mL e este foi aquecido à 30 °C em banho por 10 minutos. A fibra foi injetada e exposta aos voláteis imediatamente após a perfuração do septo do frasco. Após o tempo de extração, 10 minutos, a fibra foi retirada e desorvida na porta de injeção do cromatógrafo a gás. Este procedimento foi realizado em duplicata para as duas amostras de lúpulos pesquisadas.

#### 3.2.1 Caracterização por GC-MS

A fração de voláteis foi analisada por um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC-2010 Plus) acoplado ao espectrômetro de massas (Shimadzu GCMS-QP2010 Plus) com coluna Rtx-5MS, 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. Utilizou-se hélio como gás de arraste, injetor *split*, razão 1:5 a uma vazão de 1,78 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna nos dois minutos iniciais foi de 40 °C, sendo programada para ter acréscimos de 3 °C a cada minuto, até atingir a temperatura máxima de 240 °C, permanecendo nesta temperatura máxima por 35 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 220 e 240 °C, respectivamente. A corrida foi realizada por 100 minutos (PINHEIRO et al., 2015). Este procedimento foi realizado em duplicata para as duas amostras de lúpulos pesquisadas.

Para realizar o cálculo dos índices de Kovats (IK), foi injetada no cromatógrafo uma mistura de alcanos lineares (C9 a C26) nas mesmas condições usadas na referida análise. Os constituintes do lúpulo *in natura* foram identificados mediante comparação dos valores de índice de Kovats com os valores tabelados (ADAMS, 2007), bem como comparando-se os espectros de massas obtidos com os espectros de massas existentes no banco de dados do equipamento (NIST, 2005 *software*). A porcentagem área de cada composto foi calculada pelo *software* GCMS Postrun Analysis como sendo área do pico identificado no GC-MS dividida pela área total dos picos detectados.

### 3.3 Extração por hidrodestilação (HD)

Para extração dos óleos essenciais por hidrodestilação foi utilizado o aparelho de Clevenger adaptado a um balão de fundo redondo de 1.000 mL. Ao balão, foram adicionados aproximadamente 50 g de amostra de lúpulo e 500 mL de água destilada. A extração teve duração de 3 horas e estas foram realizadas em duplicata.

Após extração, o óleo foi separado da água em um funil de separação utilizando diclorometano como solvente. À fração orgânica obtida, adicionou-se sulfato de sódio para retirada da água remanescente. Após 20 minutos, esta fração foi filtrada e concentrada em rotaevaporador à 40 °C. Na sequência, pesou-se a amostra a fim de se determinar o rendimento da extração (porcentagem de óleo em relação a massa de amostra de lúpulo). Lavou-se o balão do rotaevaporador com pequenas quantidades de diclorometano e, por fim, esta mistura foi transferida para o frasco âmbar e armazenado em freezer à -4 °C para posterior realização das análises cromatográficas.

#### 3.3.1 Caracterização por GC-MS

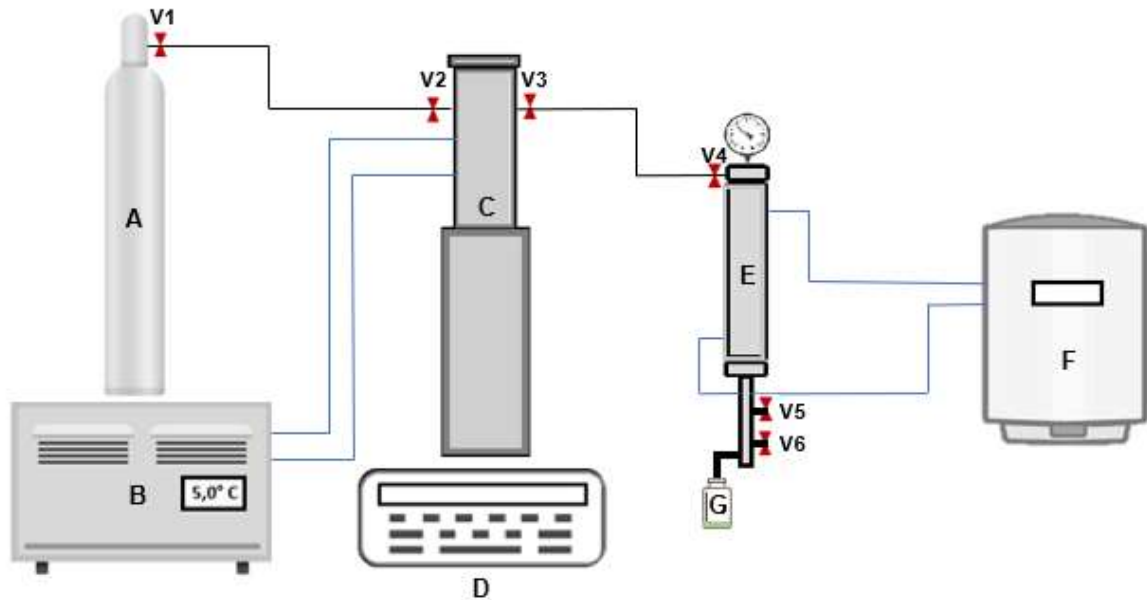
Toda a massa de extrato obtida em cada hidrodestilação foi diluída em 25 mL de metanol. As soluções foram filtradas usando filtro de seringa de nylon de 0,22 µm, sendo injetado 1 µL da mistura.

A fração de voláteis foi analisada por um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC-2010 Plus) acoplado ao espectrômetro de massas (Shimadzu GCMS-QP2010 Plus) com coluna Rtx-5MS, 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno. Utilizou-se hélio como gás de arraste, injetor *split*, razão 1:10, a uma vazão de 3 mL.min<sup>-1</sup>. A temperatura da coluna nos dois minutos iniciais foi de 40 °C, sendo programada para ter acréscimos de 3 °C a cada minuto, até atingir a temperatura máxima de 240 °C, permanecendo nesta temperatura máxima por 35 minutos. As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 220 e 240 °C, respectivamente. As corridas ocorreram por 100 minutos (PINHEIRO et al., 2015).

Para realizar o cálculo dos índices de Kovats (IK), foi injetada no cromatógrafo uma mistura de alcanos lineares (C9 a C26) nas mesmas condições usadas nas análises do referido óleo essencial. Os constituintes dos óleos foram identificados mediante comparação dos valores de índice de Kovats com os valores tabelados (ADAMS, 2007), bem como comparando-se os espectros de massas obtidos com os espectros de massas existentes no banco de dados do equipamento (NIST, 2005 *software*). A porcentagem área de cada composto foi calculada pelo *software* GCMS Postrun Analysis como sendo área do pico identificado no GC-MS dividida pela área total dos picos detectados.

### 3.4 Extração supercrítica utilizando CO<sub>2</sub> (SC)

As extrações em condições supercríticas com o uso de CO<sub>2</sub> como solvente foram realizadas em uma unidade de escala laboratorial, representada pelo esquema da Figura 3.



**Figura 3-** Esquema do equipamento utilizado na extração com CO<sub>2</sub> supercrítico.

A- Cilindro de CO<sub>2</sub>; C- Bomba de alta pressão; E- Extrator; B e F- Banho termostático; D- Controlador da pressão da bomba; V1, V2, V3, V4 – Válvulas gavetas; V5- Válvula macrométrica; V6- Válvula de expansão micrométrica; G- Frasco de coleta.

**Fonte:** O autor.

O aparato utilizado consta de um cilindro de CO<sub>2</sub>; bomba de alta pressão do tipo seringa (ISCO, 500D); extrator com diâmetro interno e altura de 1,98 e 20,5 cm, respectivamente; banho termostático (TECNAL, TE-184) para resfriar o solvente antes da entrada da bomba (TECNAL, TE-184) e banho termostático (ETHIK) para manutenção do aquecimento do extrator.

Para realização do referido experimento, seguiu-se o seguinte procedimento:

- 1- Foi verificado se todas as válvulas estavam fechadas;
- 2- Ligou-se o banho termostático a 5 °C para que o CO<sub>2</sub> não evaporasse antes de entrar no extrator;
- 3- Para preencher de solvente o reservatório da bomba, abriu-se a válvula do cilindro de CO<sub>2</sub> e a válvula da entrada da bomba (V1 e V2). Aguardou-se um período de 20 minutos para completa acomodação do CO<sub>2</sub>;
- 4- Inseriu-se 10 g de amostra no extrator, completando o seu volume com esferas de vidro;

- 5- Programou-se 90 °C no controlador de temperatura (Novus, N1100) da saída do extrator para evitar o congelamento do extrato uma vez que a expansão do gás na saída provoca o abaixamento da temperatura (efeito Joule-Thompson);
- 6- As válvulas do cilindro e da entrada da bomba (V1 e V2) foram fechadas e, em seguida, abriu-se as válvulas de alimentação do sistema (V3 e V4);
- 7- Programou-se a pressão desejada na bomba, aumentando-a, gradativamente, em intervalos de 10 em 10 bar;
- 8- Iniciou-se o período de pré-extração (30 minutos) a fim de eliminar os gradientes de temperatura e pressão no sistema de extração;
- 9- Após este período, o frasco de coleta de amostra foi encaixado no extrator;
- 10- As válvulas macrométricas (V5) e micrométricas (V6) foram delicadamente abertas para manter a vazão do solvente em 3 mL/min;
- 11- Em intervalos de 10 minutos, as válvulas V4 e V5 foram fechadas para pesagem em balança analítica da amostra de óleo contida no frasco coletor;
- 12- O fim da extração se deu quando a massa instantânea (massa do extrato/tempo) não apresentou alterações significativas em suas pesagens;
- 13- Os extratos foram mantidos em frascos de vidro âmbar a -20 °C e o aparato de extração foi depressurizado e desligado.

As condições de extração estudadas foram: 80 bar/ 60 °C (191,62 kg.m<sup>-3</sup>); 80 bar/ 40 °C (277,90 kg.m<sup>-3</sup>); 110 bar/ 60 °C (357,79 kg.m<sup>-3</sup>) e 110 bar/ 40 °C (683,52 kg.m<sup>-3</sup>). As extrações foram feitas em duplicata.

### **3.4.1 Caracterização por GC-MS**

A determinação dos componentes dos óleos essenciais extraídos por extração supercrítica seguiu a mesma metodologia aplicada aos óleos essenciais extraídos por hidrodestilação (item 1.3.1).

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Microextração em fase sólida modo *headspace***

A microextração em fase sólida modo *headspace* foi empregada para identificação dos compostos voláteis presentes nos lúpulos *in natura*. Segundo diversos autores (GONÇALVES et al., 2014; SALANTA et al., 2015; FIELD et al., 1996; VALENTE e AUGUSTO, 2000) trata-se de uma técnica simples, seletiva, rápida, livre de solvente e que reúne as etapas de concentração e injeção em processos ininterruptos. Dispondo de pouca amostra é possível identificar um grande número de compostos voláteis (GONÇALVES et al., 2014). Consiste em

uma microextração eficiente na identificação de compostos sendo, por outro lado, inviabilizada a sua aplicação em maior escala (VALENTE e AUGUSTO, 2000).

Os dados obtidos, após análise em GC-MS, foram comparados com os dados de análise em GC-MS dos extratos resultantes da extração supercrítica e hidrodestilação (Tabelas 2, 9 e 10). Em Anexo (Anexo A), estão expostos os cromatogramas gerados após análise em GC-MS dos lúpulos *in natura*.

**Tabela 2-** Áreas dos picos identificados no GC-MS dividida pela área total dos picos detectados. Para HS-SPME e HD.

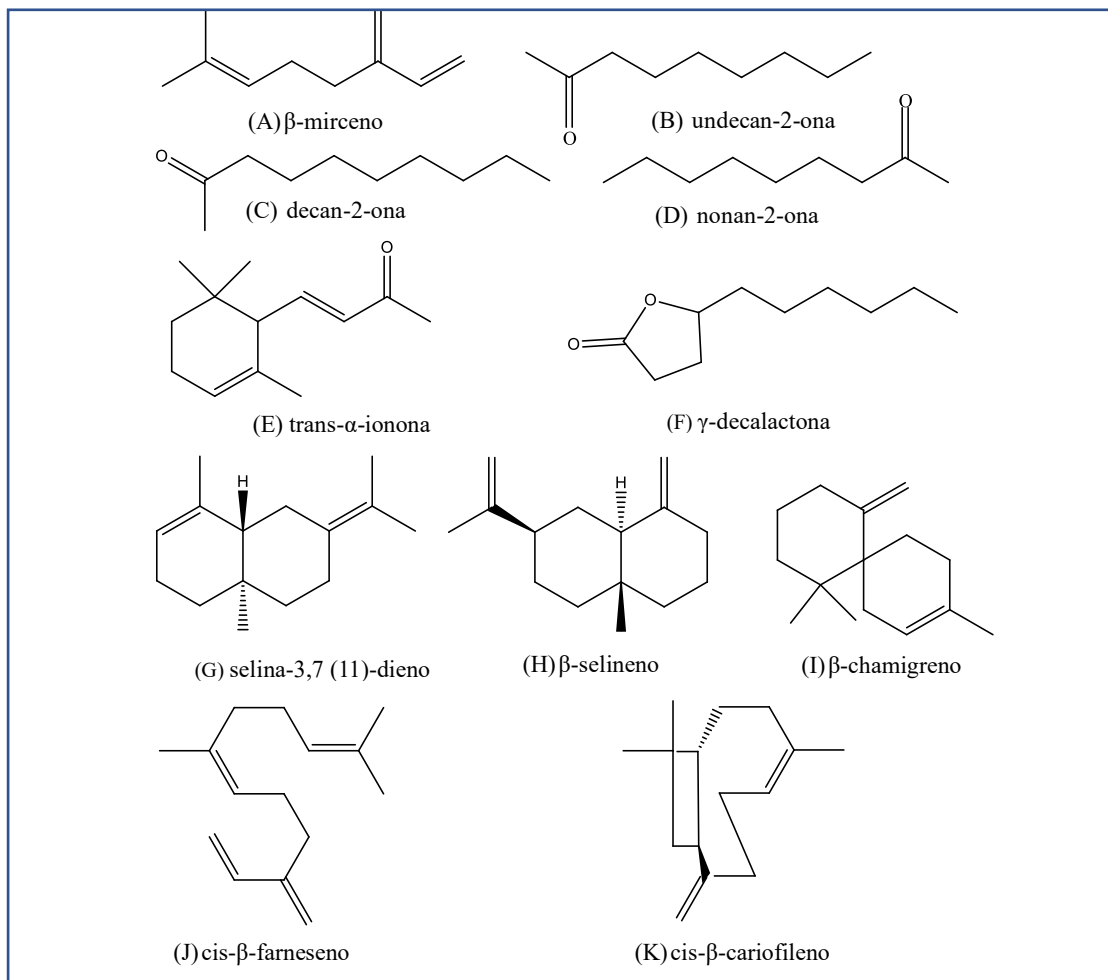
Classificação	Nº	Composto	Descrição: odor/ sabor	IR* (Tab)	PORCENTAGENS DAS ÁREA DO PICO CROMATOGRAFIA GASOSA					
					HS-SPME SP	HS-SPME MG	HD SP1	HD SP2	HD MG1	HD MG2
Hidrocarboneto monoterpeno	1	$\beta$ -pineno	Limo, pinho, amadeirado, verde, doce	980	0,86 $\pm$ 0,54 a	1,53 $\pm$ 0,05 b				
Hidrocarboneto monoterpeno	2	$\beta$ -mirceno	Resina, laranja, picante, doce, amadeirado	991	32,03 $\pm$ 8,85 a	43,54 $\pm$ 2,55 b	4,32	4,53	9,40	5,82
Cetona	3	Nonan-2-ona	Frutado, verde, gorduroso	1091	0,34 $\pm$ 0,09 a	1,68 $\pm$ 0,00 b				
Monoterpeno oxigenado	4	Linanol	Limão, lavanda, verde, floral	1098	0,24 $\pm$ 0,01 a	0,26 $\pm$ 0,02 a				
Monoterpeno oxigenado	5	Mentona	Mentolado	1154						
Cetona	6	Decan-2-ona	Cítrico	1192	0,62 $\pm$ 0,01 a	1,82 $\pm$ 0,09 b		0,40	1,00	0,44
Cetona	7	Undecan-2-ona	Frutado, verde, cítrico	1291	2,39 $\pm$ 0,72 a	4,01 $\pm$ 0,54 b	2,97	2,93	3,76	3,25
Éster	8	Decanoato de metila	Oleoso, frutado, floral	1326						
Éster	9	Cis-Acetato de carvila	Mentolado, frutado	1362						
Cetona	10	Dodecan-2-ona	-	1386		0,38 $\pm$ 0,04	0,54	0,74	0,96	0,62
Hidrocarboneto sesquiterpeno	11	Cis- $\beta$ -cariofileno	Picante, cravo	1404	6,73 $\pm$ 0,52 a	4,62 $\pm$ 0,13 a	5,22	5,32	6,92	6,58
Hidrocarboneto sesquiterpeno	12	Trans-cariofileno	Picante, amadeirado	1418	0,25 $\pm$ 0,04 a	1,27 $\pm$ 0,19 b				
Cetona	13	Trans- $\alpha$ -ionona	Floral, frutado	1426	2,84 $\pm$ 0,19 a	1,80 $\pm$ 0,23 b	3,38	4,56	3,51	3,65
Hidrocarboneto sesquiterpeno	14	Trans- $\alpha$ -bergamoteno	Amadeirado	1436					0,37	2,83
Hidrocarboneto sesquiterpeno	15	$\beta$ -humuleno	Picante, amadeirado, amargo	1440	0,37 $\pm$ 0,03 a	0,29 $\pm$ 0,05 a	0,36	0,60	0,33	0,45
Hidrocarboneto sesquiterpeno	16	Cis- $\beta$ -farneseno	Oleoso, frutado, cítrico, amadeirado	1443	18,31 $\pm$ 3,03 a	16,83 $\pm$ 0,18 a	22,35	17,42	26,02	27,53
Hidrocarboneto sesquiterpeno	17	Trans- $\beta$ -farneseno	Amadeirado, cítrico, terroso, herbal	1458	0,46 $\pm$ 0,13		0,49	0,73	0,44	0,37
Cetona	18	$\gamma$ -decalactona	Frutado, doce	1463	2,49 $\pm$ 0,45 a	1,05 $\pm$ 0,08 b	3,12	3,34	2,50	2,25
Hidrocarboneto sesquiterpeno	19	$\beta$ -chamigreno	-	1475	10,36 $\pm$ 1,98 a	4,23 $\pm$ 0,23 b	13,28	10,09	10,64	9,90
Hidrocarboneto sesquiterpeno	20	$\beta$ -selineno	-	1485	11,57 $\pm$ 2,15 a	4,93 $\pm$ 0,23 b	17,73	10,91	14,04	11,42
Hidrocarboneto sesquiterpeno	21	$\alpha$ -selineno	Apimentado	1494	0,25 $\pm$ 0,10 a		0,64	0,86	1,06	0,97
Hidrocarboneto sesquiterpeno	22	$\gamma$ -cadineno	-	1513	0,40 $\pm$ 0,08 a	0,40 $\pm$ 0,28 a	1,07	1,37	0,84	0,97
Hidrocarboneto sesquiterpeno	23	$\delta$ -cadineno	Amadeirado, herbal	1524	0,89 $\pm$ 0,08 a	0,57 $\pm$ 0,04 b	2,22	2,53	1,58	2,29
Hidrocarboneto sesquiterpeno	24	selina-3,7 (11)-dieno	Herbal, amadeirado	1542	1,27 $\pm$ 0,11 a	1,14 $\pm$ 0,09 a	2,26	2,72	0,94	1,54

Valores do HS-SPME são médias de 2 repetições. Valores seguidos por letra diferente, na mesma coluna, dentro da mesma fonte de variáveis, foram significativamente diferentes (ANOVA,  $p < 0,05$ ). IR(tab)\*: Índice de Retenção tabelado (ADAMS, 2007).

Os compostos voláteis identificados em maior concentração (considerando método de porcentagem das áreas – área do pico identificado no GC-MS dividida pela área total dos picos detectados) no lúpulo Mantiqueira de São Paulo foram (Tabela 2 e Figura 4):  $\beta$ -mirceno (A)

( $32,03 \pm 8,85$ ), *cis*- $\beta$ -farneseno ( $18,31 \pm 3,03$ ) (J),  $\beta$ -selineno ( $11,57 \pm 2,15$ ) (H),  $\beta$ -chamigreno ( $10,36 \pm 1,98$ ) (I), *cis*- $\beta$ -cariofileno ( $6,73 \pm 0,52$ ) (K), *trans*- $\alpha$ -ionona ( $2,84 \pm 0,19$ ) (E),  $\gamma$ -decalactona ( $2,49 \pm 0,4$ ) (F), undecan-2-ona ( $2,39 \pm 0,72$ ) (B), e selina-3,7 (11)-dieno ( $1,27 \pm 0,1$ ) (G).

Já os compostos majoritários identificados em lúpulo Mantiqueira cultivado em Minas Gerais foram (Tabela 2 e Figura 4):  $\beta$ -mirceno ( $43,54 \pm 2,55$ ) (A), *cis*- $\beta$ -farneseno ( $16,83 \pm 0,18$ ) (J),  $\beta$ -selineno ( $4,93 \pm 0,23$ ) (G), *cis*- $\beta$ -cariofileno ( $4,62 \pm 0,13$ ) (K),  $\beta$ -chamigreno ( $4,23 \pm 0,2$ ) (I), undecan-2-ona ( $4,01 \pm 0,54$ ) (B), decan-2-ona ( $1,82 \pm 0,09$ ) (C), *trans*- $\alpha$ -ionona ( $1,80 \pm 0,23$ ) (E) e nonan-2-ona ( $1,68 \pm 0,00$ ) (D). Os perfis apresentados possuem semelhanças com perfis expostos em outros estudos (SALANTA et al., 2015; GONÇALVES et al., 2014; LIU et al. 2018).



**Figura 4-** Principais componentes do perfil aromático dos lúpulos Mantiqueira *in natura*.  
**Fonte:** O autor.

Segundo Pfaf-Šovljanski et al (2005), o mirceno, o humuleno, o cariofileno e o farneseno são os quatro componentes principais dos óleos essenciais de lúpulo, sendo que os mesmos constituem cerca de 60-80% do óleo essencial da maioria das variedades. Para lúpulo Mantiqueira cultivado em São Paulo,  $\beta$ -mirceno, cis- $\beta$ -farneseno, trans- $\beta$ -farneseno,  $\beta$ -humuleno, trans- $\beta$ -cariofileno e cis- $\beta$ -cariofileno representam juntos 58,15% dos componentes identificados. Para a amostra cultivada em Minas Gerais  $\beta$ -mirceno, cis- $\beta$ -farneseno, trans- $\beta$ -cariofileno e cis- $\beta$ -cariofileno representam juntos 66,55% dos componentes identificados. O primeiro resultado se aproxima do indicado pelos autores e o segundo está concordância com o que foi apontado.

VÁZQUEZ-ARAÚJO et al. (2013) também reportou  $\beta$ -mirceno, cis- $\beta$ -cariofileno e  $\beta$ -farneseno como compostos majoritários. Na microextração em fase sólida modo *headspace* realizada, amostras de lúpulos Perle alemão, Nugget espanhol da Galícia, Nugget espanhol de León e Saaz espanhol da Galícia apresentaram os seguintes perfis:  $\beta$ -mirceno (40,55%; 43,28%; 45,16% e 41,57% respectivamente); cis- $\beta$ -cariofileno (0,42%; 0,41%; 0,41% e 0,53% respectivamente);  $\beta$ -farneseno (0,08%; 0,00%; 0,00% e 6,38%, respectivamente). Estes dados foram calculados utilizando-se curvas de calibração com padrões comerciais. Percebe-se que o  $\beta$ -mirceno, assim como para lúpulos Mantiqueira pesquisados no presente trabalho, também consiste no principal composto das variedades estudadas por VÁZQUEZ-ARAÚJO et al. (2013).

As diferenças nas áreas dos picos identificadas entre as amostras bem como a identificação de alguns componentes não comuns às duas amostras, devem-se a diferenças climáticas, diferentes taxas de adaptação da planta ao ambiente, diferenças de solos e relevo (SALANTA et al., 2015). Entretanto, mesmo sendo cultivados em locais diferentes, submetidos a condições edafoclimáticas distintas, as amostras de lúpulo Mantiqueira apresentaram um perfil aproximado, sendo a maior parte dos compostos identificados comuns às duas amostras. São esses compostos:  $\beta$ -pineno;  $\beta$ -mirceno, nonan-2-ona, linanol, decan-2-ona, undecan-2-ona, cis- $\beta$ -cariofileno, trans- $\beta$ -cariofileno, trans- $\alpha$ -ionona,  $\beta$ -humuleno, cis- $\beta$ -farneseno,  $\gamma$ -decalactona,  $\beta$ -chamigreno,  $\beta$ -selineno,  $\gamma$ -cadineno,  $\delta$ -cadineno e selina-3,7-(11)-dieno.

Os compostos identificados apenas em amostras de São Paulo foram os hidrocarbonetos sesquiterpenos: trans- $\beta$ -farneseno e  $\alpha$ -selineno juntos representam 0,71% dos compostos identificados. Já o único composto identificado apenas em amostra cultivada em Minas Gerais foi a cetona dodecan-2-ona que representa 0,38% dos compostos identificados.

Compostos do grupo dos hidrocarbonetos sesquiterpenos mostraram-se abundantes no perfil dos voláteis (50,89% e 34,28% em lúpulos de São Paulo e Minas Gerais, respectivamente) conferindo odores e sabores frutados ao lúpulo (OPSTAELE, 2012). Hidrocarbonetos monoterpênicos também são expressivos (32,89% e 45,07% em lúpulos de São Paulo e Minas Gerais, respectivamente), atribuindo também sabores e odores picantes à variedade (OPSTAELE, 2012) (Tabela 3).

**Tabela 3-** Porcentagens das áreas dos picos dos compostos identificados nos cromatogramas separados em grupos. Para amostras de HS-SPME.

Grupo	% Área	
	HS-SPME SP	HS-SPME MG
Não identificados (%)	7,32	9,70
Hidrocarbonetos sesquiterpenos (%)	50,89	34,28
Hidrocarbonetos monoterpênicos (%)	32,89	45,07
Monoterpenos oxigenados (%)	0,24	0,26
Outros compostos (%)	8,66	10,69
<b>Total identificado (%)</b>	<b>92,68</b>	<b>90,30</b>

Uma vez que ainda não é reportado na literatura dados sobre a composição química de voláteis de lúpulos cultivados no Brasil, não é possível fazer uma comparação direta com estudos que utilizam a variedade Mantiqueira. Entretanto, percebe-se que a variedade estudada apresenta perfil de voláteis semelhante ao perfil de lúpulos cultivados em países de clima temperado. Desta forma, a variedade brasileira Mantiqueira consiste em um lúpulo com potencial comercial para ser utilizado na produção de cerveja, mesmo sendo cultivado em clima tropical, apresenta características aromáticas próximas a algumas variedades de lúpulos importados.

#### 4.2 Extração por hidrodestilação

A metodologia de separação de óleos essenciais utilizando aparelho de Clevenger foi utilizada em amostras de lúpulo Mantiqueira provenientes de São Paulo e Minas Gerais. Trata-se de em uma metodologia de extração líquido-líquido comumente utilizada para traçar o perfil volátil de compostos de espécies de plantas (SALANTA et al., 2015).

Na Tabela 4 estão dispostas as massas de lúpulo utilizadas, as massas de óleos obtidas, bem como o rendimento de cada destilação.

**Tabela 4-** Massa de lúpulo, massa do óleo e rendimento obtidos nas hidrodestilações.

Amostras	Massa Lúpulo (g)	Massa óleo (g)	Rendimento (%)*
HD SP1	49,93	0,10	0,19
HD SP2	50,07	0,08	0,17
HD MG1	50,05	0,17	0,34
HD MG2	50,01	0,14	0,28

**Rendimento\*:** Massa do óleo dividida pela massa do lúpulo, multiplicada por 100.

O rendimento médio da hidrodestilação foi de  $0,18 \pm 0,01\%$  e  $0,31 \pm 0,04\%$  para lúpulos Mantiqueira de São Paulo e Minas Gerais, respectivamente. Percebe-se que a técnica extraiu uma quantidade um pouco maior de óleo de lúpulo Mantiqueira cultivado em Minas Gerais. Entretanto, de acordo com Rybka et al. (2018), os óleos essenciais representam cerca de 0,5 a 3% em massa do lúpulo seco, evidenciando que o método de extração apresentou rendimento abaixo do esperado. Os cromatogramas gerados após análises dos óleos em GC-MS estão em Anexo (Anexo B).

Para extrato proveniente de lúpulo Mantiqueira de São Paulo, os compostos que foram identificados nas duas amostras (Tabela 2) foram o hidrocarboneto monoterpeneo:  $\beta$ -mirceno; as cetonas: undecan-2-ona; trans- $\alpha$ -ionona; dodecan-2-ona;  $\gamma$ -decalactona; os hidrocarbonetos sesquiterpenos: cis- $\beta$ -cariofileno;  $\beta$ -humuleno, cis- $\beta$ -farneseno; trans- $\beta$ -farneseno;  $\beta$ -selineno;  $\alpha$ -selineno;  $\gamma$ -cadineno;  $\beta$ -chamigreno;  $\delta$ -cadineno e selina-3,7 (11)-dieno. Apenas a cetona decan-2-ona que não foi identificada em duplicata.

Em ambas as amostras de lúpulo Mantiqueira cultivado em Minas Gerais foram identificados os mesmos compostos. São eles, o hidrocarboneto monoterpeneo  $\beta$ -mirceno; as cetonas: decan-2-ona; undecan-2-ona; dodecan-2-ona;  $\gamma$ -decalactona; os hidrocarboneto sesquiterpenos: cis- $\beta$ -cariofileno; trans- $\alpha$ -ionona; trans- $\beta$ -farneseno; cis- $\beta$ -farneseno; trans- $\alpha$ -bergamoteno;  $\beta$ -humuleno;  $\gamma$ -decalactona;  $\beta$ -chamigreno;  $\beta$ -selineno;  $\alpha$ -selineno;  $\delta$ -cadineno e selina-3,7(11)-dieno.

Os principais componentes dos óleos tanto de lúpulo de São Paulo quanto de Minas Gerais foram os hidrocarbonetos sesquiterpenos cis- $\beta$ -farneseno e o  $\beta$ -selineno. Estes compostos conferem aroma frutado, cítrico, amadeirado e picante aos óleos.

Na Tabela 5 estão dispostas as médias da duplicata das áreas dos principais picos identificados nos cromatogramas gerados após análise em GC-MS de todas as amostras:

**Tabela 5-** Médias da duplicata das áreas dos principais picos identificados nos cromatogramas gerados após análise em GC-MS dos óleos.

N°	Composto	Porcentagens das Área do pico Cromatografia Gasosa											
		HS-SPME SP	HS-SPME MG	HD SP	HD MG	SC-SP				SC-MG			
						80 bar/60 ° C	80 bar/40 ° C	110 bar/60 ° C	110 bar/40 ° C	80 bar/60 ° C	80 bar/40 ° C	110 bar/60 ° C	110 bar/40 ° C
2	$\beta$ -mirreno	32,03 $\pm$ 8,85 a	43,54 $\pm$ 2,55 b	4,43 $\pm$ 0,15	7,61 $\pm$ 2,53			0,11 $\pm$ 0,04	0,15 $\pm$ 0,00	3,17 $\pm$ 1,32	9,05 $\pm$ 11,03	0,26 $\pm$ 0,11	0,22 $\pm$ 0,06
3	Nonan-2-ona	0,34 $\pm$ 0,09 a	1,68 $\pm$ 0,00 b										
5	Mentona					28,66 $\pm$ 0,83	34,30 $\pm$ 4,84	0,12 $\pm$ 0,11	0,10 $\pm$ 0,06	15,32 $\pm$ 15,10	22,74 $\pm$ 25,92	1,32 $\pm$ 1,70	0,39 $\pm$ 0,45
6	Decan-2-ona	0,62 $\pm$ 0,01 a	1,82 $\pm$ 0,09 b	0,40	0,72 $\pm$ 0,40								
7	Undecan-2-ona	2,39 $\pm$ 0,72 a	4,01 $\pm$ 0,54 b	2,95 $\pm$ 0,03	3,51 $\pm$ 0,36								
8	Decanoato de metila					46,22 $\pm$ 3,78	32,40 $\pm$ 8,27	0,12 $\pm$ 0,08	0,17 $\pm$ 0,16	21,44 $\pm$ 21,17	20,94 $\pm$ 19,31	2,34 $\pm$ 3,12	0,38 $\pm$ 0,40
11	Cis- $\beta$ -cariofileno	6,73 $\pm$ 0,52 a	4,62 $\pm$ 0,13 a	5,27 $\pm$ 0,07	6,75 $\pm$ 0,24								
13	Trans- $\alpha$ -ionona	2,84 $\pm$ 0,19 a	1,80 $\pm$ 0,23 b	3,97 $\pm$ 0,83	3,58 $\pm$ 0,10								
16	Cis- $\beta$ -farneseno	18,31 $\pm$ 3,03 a	16,83 $\pm$ 0,18 a	19,89 $\pm$ 3,49	26,78 $\pm$ 1,07						6,34		
18	$\gamma$ -decalactona	2,49 $\pm$ 0,45 a	1,05 $\pm$ 0,08 b	3,23 $\pm$ 0,16	2,38 $\pm$ 0,18				0,28				
19	$\beta$ -chamigreno	10,36 $\pm$ 1,98 a	4,23 $\pm$ 0,23 b	11,69 $\pm$ 2,26	10,27 $\pm$ 0,52			0,13	0,25 $\pm$ 0,06		14,08	0,09	
20	$\beta$ -selineno	11,57 $\pm$ 2,15 a	4,93 $\pm$ 0,23 b	14,32 $\pm$ 4,82	12,73 $\pm$ 1,85			0,2	0,32 $\pm$ 0,11		12,81	1,46 $\pm$ 1,83	0,03
21	$\alpha$ -selineno	0,25 $\pm$ 0,10 a		0,75 $\pm$ 0,16	1,02 $\pm$ 0,06	25,13 $\pm$ 2,95	15,81	0,05 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,11	8,89 $\pm$ 9,85	5,60 $\pm$ 2,68	0,06	
24	selina-3,7 (11)-dieno	1,27 $\pm$ 0,11 a	1,14 $\pm$ 0,09 a	2,49 $\pm$ 0,33	1,24 $\pm$ 0,42								
25	Atractilona						22,44 $\pm$ 18,80	0,35 $\pm$ 0,18		6,89	0,90	0,57	
26	Bergapteno							0,08 $\pm$ 0,00			14,96		
29	Trans-ferruginol								5,87 $\pm$ 5,10			7,15	3,25
30	Abietol							48,13 $\pm$ 0,49	33,29 $\pm$ 1,58	52,36		43,10 $\pm$ 11,70	52,50 $\pm$ 4,69
31	NI						10,15	30,85 $\pm$ 7,65	46,16 $\pm$ 1,04	32,37		26,50 $\pm$ 0,10	32,63 $\pm$ 1,03

Os valores sem desvio padrão são os picos que foram identificados em apenas uma das amostras da duplicata.

Na classificação sugerida por Korfta (2003), porcentagens de  $\beta$ -farneseno entre 14 e 20% (em massa) enquadra o óleo de lúpulo como óleo nobre, o que sugere, pelos valores elevados de porcentagens de áreas identificadas nos cromatogramas, que ambos os óleos se enquadram nesses grupos.

Compostos do grupo dos hidrocarbonetos sesquiterpenos mostraram-se abundantes no perfil dos voláteis de lúpulo de São Paulo (65,62% e 52,55% amostras Hidro SP1 e Hidro SP2,

respectivamente) e no perfil de voláteis de lúpulos de Minas Gerais (63,18% e 64,85%, amostras Hidro MG1 e Hidro MG2, respectivamente), conferindo odores e sabores frutados aos extratos hidrodestilados (OPSTAELE, 2012) (Tabela 6).

**Tabela 6-** Porcentagens das áreas dos picos dos compostos identificados nos cromatogramas separados em grupos. Para amostras de HD.

Grupo	% Área			
	Hidro SP1	Hidro SP2	Hidro MG1	Hidro MG2
Não identificados (%)	20,05	30,95	15,69	19,12
Hidrocarbonetos sesquiterpenos (%)	65,62	52,55	63,18	64,85
Hidrocarbonetos monoterpenos (%)	4,32	4,53	9,40	5,82
Monoterpenos oxigenados (%)	0,00	0,00	0,00	0,00
Outros compostos (%)	10,01	11,97	11,73	10,21
<b>Total identificado (%)</b>	<b>79,95</b>	<b>69,05</b>	<b>84,31</b>	<b>80,88</b>

### 4.3 Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico

Foram estudadas as pressões de 80 e 110 bar e temperaturas de 40 e 60 °C. Segundo Katono, Yonezawa e Inui (2018) quando a pressão é menor que a faixa citada, é difícil manter um estado supercrítico de maneira estável. Por outro lado, quando a pressão é maior que 100 bar, componentes como  $\alpha$ -ácidos, são extraídos em maiores quantidades. Temperaturas elevadas comprometem a extração de voláteis.

Na Tabela 7 estão dispostas as condições de extração (pressão, temperatura e tempo), as massas de amostras, massas de esferas de vidros, de extratos gerados, bem como o rendimento de cada extração para lúpulo Mantiqueira cultivado em São Paulo.

**Tabela 7-** Condições experimentais e rendimentos obtidos na extração de lúpulo Mantiqueira cultivado em São Paulo com CO<sub>2</sub> supercrítico.

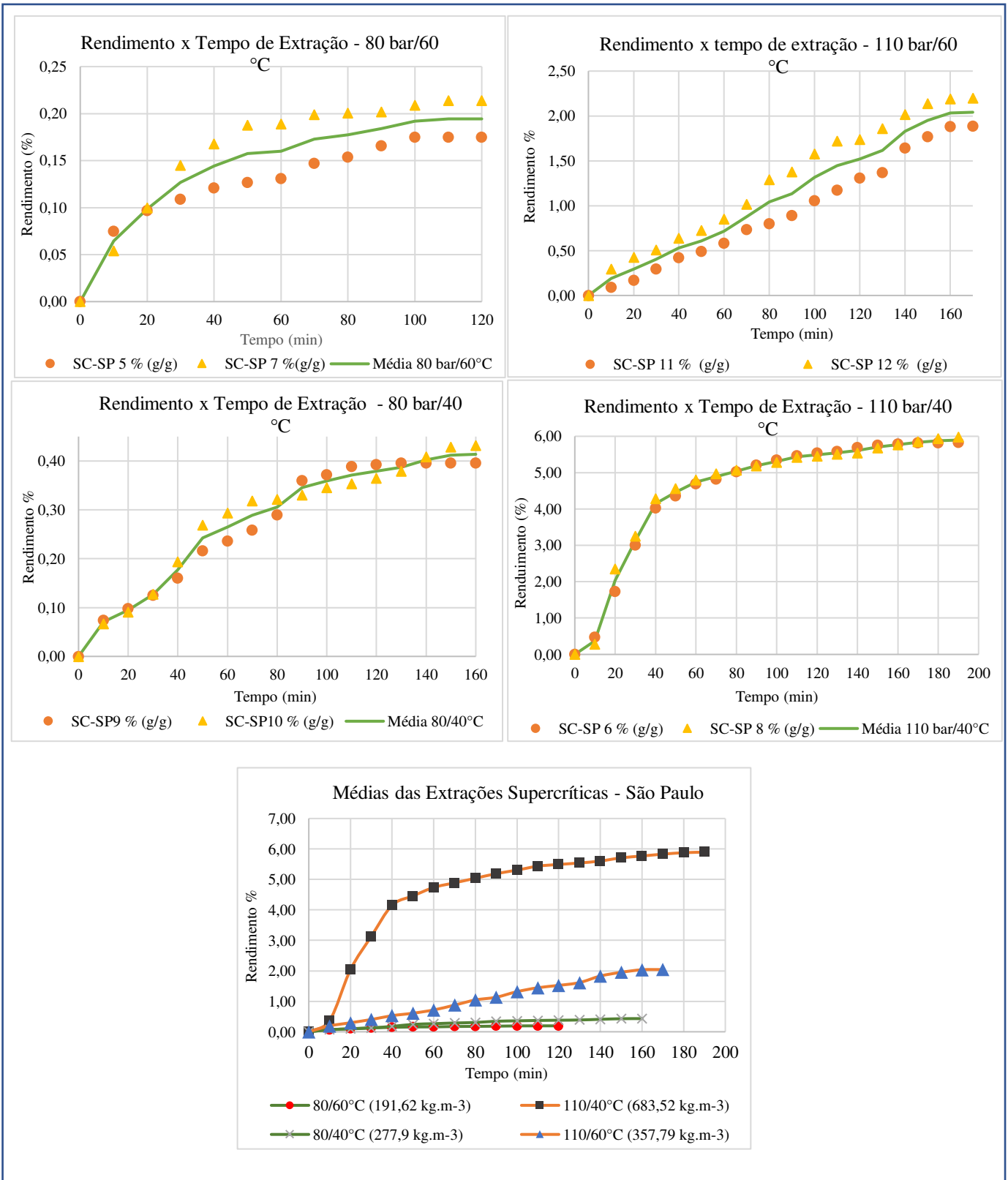
<b>Amostra</b>	<b>Pressão (bar)</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Densidade CO<sub>2</sub> (kg.m<sup>-3</sup>)</b>	<b>Massa Lúpulo (g)</b>	<b>Massa esferas de vidro (g)</b>	<b>Tempo de extração (min)</b>	<b>Massa extrato (g) x 10<sup>2</sup></b>	<b>(%)*</b>
SC-SP 5	80	60	191,62	10,00	15,32	120	1,75	0,17
SC-SP 7	80	60	191,62	10,01	14,64	120	2,14	0,21
SC-SP 9	80	40	277,90	10,00	7,964	130	3,96	0,40
SC-SP 10	80	40	277,90	10,01	8,54	160	4,32	0,43
SC-SP 11	110	60	357,79	10,01	5,69	170	1,89	1,88
SC-SP 12	110	60	357,79	10,01	6,60	170	22,00	2,20
SC-SP 6	110	40	683,52	10,00	10,03	190	58,21	5,82
SC-SP 8	110	40	683,52	10,01	9,30	190	59,76	5,90

(%)\*: Rendimento- massa do óleo dividida pela massa do lúpulo, multiplicada por 100.

Os rendimentos médios para cada condição de extração foram:

- 80 bar/60 °C: (0,19 ± 0,03 %);
- 80 bar/40 °C: (0,41 ± 0,03 %);
- 110 bar/60 °C: (2,04 ± 0,22 %);
- 110 bar/40 °C: (5,90 ± 0,10%).

A seguir (Figura 5) são apresentadas as curvas cinéticas de extração do lúpulo Mantiqueira cultivado em São Paulo para diferentes condições de extração (Tabela 7):



**Figura 5-** Curvas cinéticas experimentais de extração do lúpulo Mantiqueira cultivado em São Paulo para diferentes condições de extração.

Na Tabela 8 estão dispostas as condições de extração (pressão, temperatura e tempo), as massas de amostras, massas de esferas de vidros, massas de extratos gerados, bem como o rendimento de cada extração para lúpulo Mantiqueira cultivado em Minas Gerais.

**Tabela 8-** Condições experimentais e rendimentos obtidos na extração de lúpulo Mantiqueira cultivado em Minas Gerais com CO<sub>2</sub> supercrítico.

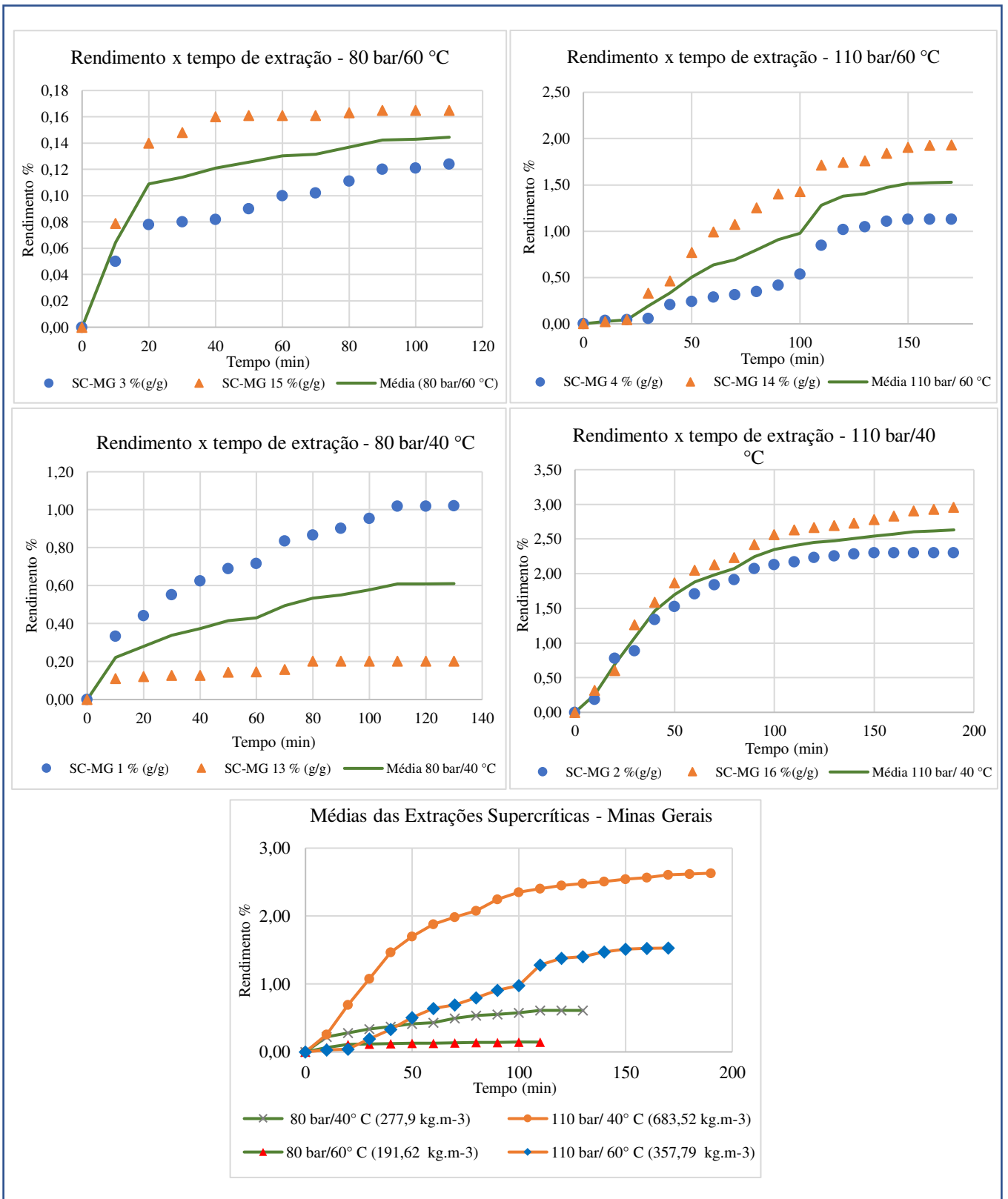
Amostra	Pressão (bar)	Temperatura (°C)	Densidade de CO <sub>2</sub> (kg.m <sup>-3</sup> )	Massa Lúpulo (g)	Massa esferas de vidro (g)	Tempo de extração (min)	Massa extrato (g) x 10 <sup>2</sup>	(%) *
SC-MG 3	80	60	191,62	10,00	16,79	11	1,24	0,12
SC-MG 15	80	60	191,62	10,00	17,55	90	1,65	0,17
SC-MG 1	80	40	277,90	10,01	17,58	130	10,20	1,02
SC-MG 13	80	40	277,90	10,00	15,85	90	2,02	0,20
SC-MG 4	110	60	357,79	10,00	10,81	160	11,27	1,13
SC-MG 14	110	60	357,79	10,00	12,06	170	19,31	1,93
SC-MG 2	110	40	683,52	10,00	14,71	150	23,05	2,30
SC-MG 16	110	40	683,52	10,00	15,47	190	29,59	2,96

(%)\*: Rendimento- massa do óleo dividida pela massa do lúpulo, multiplicada por 100.

Os rendimentos médios para cada condição de extração foram:

- 80 bar/60 °C: (0,14 ± 0,03 %);
- 80 bar/40 °C: (0,61 ± 0,58 %);
- 110 bar/60 °C: (1,53 ± 0,57 %);
- 110 bar/40 °C: (2,63 ± 0,46 %);

A seguir (Figura 6) são apresentadas as curvas cinéticas de extração do lúpulo Mantiqueira cultivado em Minas Gerais para diferentes condições de extração (Tabela 8):



**Figura 6-** Curvas cinéticas experimentais de extração do lúpulo Mantiqueira cultivado em Minas Gerais para diferentes condições de extração.

Percebe-se que quanto maior a densidade do fluido supercrítico, maior o rendimento apresentado, sendo assim, a condição que resultou em maior rendimento foi a 110 bar e 40 °C. O aumento da pressão a uma temperatura constante acarreta um aumento da densidade do solvente. Desta forma, a distância intermolecular média é reduzida e a interação entre moléculas do solvente e do soluto é aumentada, elevando, desta forma, a solubilidade do soluto. Por outro lado, o aumento de temperatura a uma pressão constante resulta em uma diminuição da densidade do solvente e em um aumento da pressão de vapor do soluto. Conseqüentemente, a solubilidade do soluto diminui (SMITH; VAN NESS; ABBOTT, 2007).

Kupski et al. (2017) também confirmou que o rendimento de uma extração supercrítica de fato é aumentado com o aumento da pressão. Zarrinpashne e Kandi (2018) também constataram que a 40 °C os rendimentos de óleos são maiores que a 60 °C. Todavia, o rendimento não deve ser o único fator a ser avaliado. Com o aumento do rendimento, a seletividade da extração pode ser comprometida, obtendo-se uma variedade de componentes que podem incluir tanto resinas duras quanto taninos e comprometer a qualidade do extrato. Em anexo (Anexo C e D), estão dispostos os cromatogramas gerados pelas extrações com dióxido de carbono supercrítico.

Nas Tabelas 9 e 10 estão dispostos os compostos e suas respectivas áreas dos picos identificados no GC-MS dividida pela área total dos picos detectados para SC de São Paulo e Minas Gerais. Respectivamente.

**Tabela 9-** Áreas dos picos identificados no GC-MS dividida pela área total dos picos detectados. Para SC-SP.

Classificação	Nº	Composto	IR (tab)	Descrição: odor/ sabor	EXTRAÇÃO SUPERCRTICA AMOSTRAS SÃO PAULO								
					80 bar/ 60 °C	80 bar/ 60 °C	80 bar/ 40 °C	80 bar/ 40 °C	110 bar/ 60 °C	110 bar/ 60 °C	110 bar/ 40 °C	110 bar/ 40 °C	
Hidrocarboneto monoterpeneo	1	$\beta$ -pineno	980	Limo, pinho, amadeirado, verde, doce									
Hidrocarboneto monoterpeneo	2	$\beta$ -mirceno	991	Resina, laranja, picante, doce, amadeirado					0,08	0,13	0,15	0,15	
Cetona	3	Nonan-2-ona	1091	Frutado, verde, gorduroso									
Monoterpeneo oxigenado	4	Linanol	1098	Limão, lavanda, verde, floral									
Monoterpeneo oxigenado	5	Mentona	1154	Mentolado	28,07	29,25	30,88	37,72	0,04	0,19	0,05	0,14	
Cetona	6	Decan-2-ona	1192	Cítrico									
Cetona	7	Undecan-2-ona	1291	Frutado, verde, cítrico									
Éster	8	Decanoato de metila	1326	Oleoso, frutado, floral	48,89	43,54	38,24	26,55	0,06	0,17	0,06	0,28	
Éster	9	Cis-Acetato de carvila	1362	Mentolado, frutado									
Cetona	10	Dodecan-2-ona	1386	-									
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	11	Cis- $\beta$ -cariofileno	1404	Picante, cravo									
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	12	Trans-cariofileno	1418	Picante, amadeirado									
Cetona	13	Trans- $\alpha$ -ionona	1426	Floral, frutado									
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	14	Trans- $\alpha$ -bergamotene	1436	Amadeirado									
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	15	$\beta$ -humuleno	1440	Picante, amadeirado, amargo									
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	16	Cis- $\beta$ -farneseno	1443	Oleoso, frutado, cítrico, amadeirado									
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	17	Trans- $\beta$ -farneseno	1458	Amadeirado, cítrico, terroso, herbal									0,26
Cetona	18	$\gamma$ -decalactona	1463	Frutado, doce									
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	19	$\beta$ -chamigreno	1475	-					0,13		0,20	0,29	
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	20	$\beta$ -selineno	1485	-					0,20		0,24	0,39	
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	21	$\alpha$ -selineno	1494	Apimentado	23,04	27,21	15,81		0,04	0,06	0,03	0,19	
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	22	$\gamma$ -cadineno	1513	-									
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	23	$\delta$ -cadineno	1524	Amadeirado, herbal									
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	24	selina-3,7 (11)-dieneo	1542	Herbal, amadeirado									
Cetona	25	Atractilona	1653	-			9,15	35,73	0,48	0,22			
Hidrocarboneto	26	Bergapteno	2048	Cítrico, laranja, limão					0,07	0,08			
Éster	27	Octadecanoato de metila	2128	-									
Fenoxinol	28	Tricosano	2300	Cera					1,29		0,46	2,26	
Monoterpeneo oxigenado	29	Trans-ferruginol	2325	-							2,26	9,47	
Diterpeneo	30	Abietol	2391	-					48,48	47,78	32,17	34,40	
-	31	NI	2455	-					25,44	36,26	45,42	46,89	

**Tabela 10-** Áreas dos picos identificados no GC-MS dividida pela área total dos picos detectados. Para SC-MG.

Classificação	Nº	Composto	IR (tab)	Descrição: odor/ sabor	Extração Supercrítica Amostras Minas Gerais							
					80 bar/ 60 °C	80 bar/ 60 °C	80 bar/ 40 °C	80 bar/ 40 °C	110 bar/ 60 °C	110 bar/ 60 °C	110 bar/ 40 °C	110 bar/ 40 °C
Hidrocarboneto monoterpeneo	1	$\beta$ -pineno	980	Limo, pinho, amadeirado, verde, doce			11,58					
Hidrocarboneto monoterpeneo	2	$\beta$ -mirceno	991	Resina, laranja, picante, doce, amadeirado	4,10	2,24	1,25	16,85	0,34	0,18	0,26	0,18
Cetona	3	Nonan-2-ona	1091	Frutado, verde, gorduroso								
Monoterpeneo oxigenado	4	Linanol	1098	Limão, lavanda, verde, floral								
Monoterpeneo oxigenado	5	Mentona	1154	Mentolado	25,99	4,64	4,41	41,07	2,52	0,11	0,70	0,07
Cetona	6	Decan-2-ona	1192	Cítrico								
Cetona	7	Undecan-2-ona	1291	Frutado, verde, cítrico								
Éster	8	Decanoato de metila	1326	Oleoso, frutado, floral	36,41	6,47	7,28	34,59	4,54	0,13	0,66	0,10
Éster	9	Cis-Acetato de carvila	1362	Mentolado, frutado								
Cetona	10	Dodecan-2-ona	1386	-								
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	11	Cis- $\beta$ -cariofileno	1404	Picante, cravo								
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	12	Trans-cariofileno	1418	Picante, amadeirado								
Cetona	13	Trans- $\alpha$ -ionona	1426	Floral, frutado								
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	14	Trans- $\alpha$ -bergamotene	1436	Amadeirado								
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	15	$\beta$ -humuleno	1440	Picante, amadeirado, amargo								
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	16	Cis- $\beta$ -farneseno	1443	Oleoso, frutado, cítrico, amadeirado			6,34					
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	17	Trans- $\beta$ -farneseno	1458	Amadeirado, cítrico, terroso, herbal								
Cetona	18	$\gamma$ -decalactona	1463	Frutado, doce								
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	19	$\beta$ -chamigreno	1475	-			14,08			0,09		
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	20	$\beta$ -selineno	1485	-			12,81		2,75	0,16		0,03
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	21	$\alpha$ -selineno	1494	Apimentado	15,85	1,92	3,70	7,49		0,06		
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	22	$\gamma$ -cadineno	1513	-								
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	23	$\delta$ -cadineno	1524	Amadeirado, herbal								
Hidrocarboneto sesquiterpeneo	24	selina-3,7 (11)-dieno	1542	Herbal, amadeirado								
Cetona	25	Atractilona	1653	-	6,89		0,90			0,57		
Hidrocarboneto	26	Bergapteno	2048	Cítrico, laranja, limão			14,96					
Éster	27	Octadecanoato de metila	2128	-	2,00		6,80					
Fenoxinois	28	Tricosano	2300	Cera						3,06		1,44
Monoterpeneo oxigenado	29	Trans-ferruginol	2325	-						7,15		3,25
Diterpeneo	30	Abietol	2391	-		52,36			51,36	34,8	55,81	49,18
-	31	NI	2455	-		32,37			26,39	26,5	33,35	31,90

Os compostos comuns as duas extrações nas mesmas condições (duplicata) foram as seguintes (Tabela 9 e 10):

Amostras de São Paulo:

**80 bar/60 °C:** o monoterpene oxigenado mentona; o éster decanoato de metila; e o hidrocarboneto sesquiterpeno  $\alpha$ -selineno.

**80 bar/40 °C:** o monoterpene oxigenado mentona; o éster decanoato de metila; e a cetona atractilona.

**110 bar/60 °C:** o hidrocarboneto monoterpene  $\beta$ -mirceno; o monoterpene oxigenado mentona; o éster decanoato de metila; o hidrocarboneto sesquiterpeno  $\alpha$ -selineno; a cetona atractilona; o hidrocarboneto bergapteno; o diterpeno abietol e um composto não identificado.

**110 bar/40 °C:** o hidrocarboneto monoterpene  $\beta$ -mirceno; os monoterpenos oxigenados mentona e trans-ferruginol; o éster decanoato de metila; os hidrocarbonetos sesquiterpenos:  $\beta$ -chamigreno;  $\beta$ -selineno;  $\alpha$ -selineno; o fenoxinol tricosano; o diterpeno abietol e um composto não identificado.

Amostras de Minas Gerais:

**80 bar/60 °C:** o hidrocarboneto monoterpene  $\beta$ -mirceno; o monoterpene oxigenado mentona; o éster decanoato de metila e o hidrocarboneto sesquiterpeno  $\alpha$ -selineno.

**80 bar/40 °C:** o hidrocarboneto monoterpene  $\beta$ -mirceno; o monoterpene oxigenado mentona; o éster decanoato de metila e o hidrocarboneto sesquiterpeno  $\alpha$ -selineno.

**110 bar/60 °C:** o hidrocarboneto monoterpene  $\beta$ -mirceno; o monoterpene oxigenado mentona; o éster decanoato de metila; o hidrocarboneto sesquiterpeno  $\beta$ -selineno; o diterpeno abietol e um composto não identificado.

**110 bar/40 °C:** o hidrocarboneto monoterpene  $\beta$ -mirceno; o monoterpene oxigenado mentona; o éster decanoato de metila; o diterpeno abietol e um composto não identificado.

Na Tabela 11 estão dispostas as porcentagens das áreas dos picos dos compostos separados em grupos para amostras de SC.

**Tabela 11-** Porcentagens das áreas dos picos dos compostos identificados nos cromatogramas separados em grupos. Para amostras de SC.

Grupo	Extração Supercrítica Amostras São Paulo								Extração Supercrítica Amostras Minas Gerais							
	80 bar/ 60° C	80 bar/ 60° C	80 bar/ 40° C	80 bar/ 40° C	110 bar/ 60° C	110 bar/ 60° C	110 bar/ 40° C	110 bar/ 40° C	80 bar/ 60° C	80 bar/ 60° C	80 bar/ 40° C	80 bar/ 40° C	110 bar/ 60° C	110 bar/ 60° C	110 bar/ 40° C	110 bar/ 40° C
Não identificados (%)	0,00	0,00	5,92	0,00	23,69	15,11	18,96	5,28	8,76	0,00	15,89	0,00	12,10	27,14	9,22	13,85
Hidrocarbonetos sesquiterpenos (%)	23,04	27,21	15,81	0,00	0,37	0,06	0,47	1,13	15,85	1,92	36,93	7,49	2,75	0,31	0,00	0,03
Hidrocarbonetos monoterpenos (%)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,13	0,15	0,15	4,10	2,24	12,83	16,85	0,34	0,18	0,26	0,00
Monoterpenos oxigenados (%)	28,07	29,25	30,88	37,72	0,04	0,19	2,31	9,61	25,99	4,64	4,41	41,07	2,52	7,26	0,70	3,32
Outros compostos (%)	48,89	43,54	47,39	62,28	75,82	84,51	78,11	83,83	45,30	91,20	29,94	34,59	82,29	65,11	89,82	82,80
<b>Total identificado (%)</b>	<b>100,00</b>	<b>100,00</b>	<b>94,08</b>	<b>100,00</b>	<b>76,31</b>	<b>84,89</b>	<b>81,04</b>	<b>94,72</b>	<b>91,24</b>	<b>100,00</b>	<b>84,11</b>	<b>100,00</b>	<b>87,90</b>	<b>72,86</b>	<b>90,78</b>	<b>86,15</b>

Em todas as extrações supercríticas, de ambas as amostras, o grupo “outros compostos” que inclui grupos químicos diferentes - cetonas, ésteres, fenoxinois e diterpenos são majoritários.

Na Tabela 5 estão dispostas as médias da duplicata das áreas dos picos identificados nos cromatogramas gerados após análise em GC-MS dos óleos obtidos por extração com dióxido de carbono supercrítico.

#### **4.4 Diferenças entre perfis voláteis obtidos por HS-SPME, HD e SC**

Como mencionado por Opstaele et al. (2012) o conteúdo dos óleos essenciais não depende apenas das condições de cultivo, armazenamento e processamento, depende também do processo de extração e análise.

O comportamento dos grupos químicos não apresentou uma tendência, de acordo com a metodologia de extração adotada. Como se trata de compostos instáveis, assim como no trabalho de Vázquez-Araújo et al. (2013), uma grande variação foi observada e nenhum padrão foi estabelecido na comparação das técnicas de extração.

Na Figura 7 foram apresentados os gráficos de radar dos perfis voláteis do lúpulo *in natura* e dos extratos (HD e SC).



**Figura 7-** Gráficos de radar dos perfis voláteis obtidos por HS-SPME, HD e SC de lúpulos Mantiqueira de São Paulo e Minas Gerais. Nestes gráficos são mostradas as proporções médias (%) de cada sabor/odor nas amostras, de acordo com os compostos identificados e suas respectivas características. **Fonte:** O autor.

Percebe-se que de fato os perfis aromáticos do lúpulo da variedade Mantiqueira cultivados em São Paulo e Minas Gerais (HS-SPME) são bem próximos, tendo como principal característica seu sabor/ odor frutado, amadeirado, picante e cítrico (Figura 7). De acordo com as Tabelas 4 e 6, amostras de São Paulo e Minas Gerais tanto nos lúpulos *in natura* quanto nos óleos obtidos por hidrodestilação, apresentam maiores proporções de hidrocarbonetos sesquiterpenos e hidrocarbonetos monoterpênicos. Conseqüentemente, a tendência é de que estes possuem, de fato, aromas amadeirados, picantes, cítricos e frutados (VÁZQUEZ-ARAÚJO et al., 2013).

Os gráficos radar dos óleos obtidos por hidrodestilação tanto de lúpulo de São Paulo quanto de Minas Gerais apresentam características predominantes frutado, amadeirado, cítrico e picante. Os perfis aromáticos apresentados por ambas as amostras são bem próximos, com o predomínio do componente *cis*- $\beta$ -farneseno. Os níveis totais de hidrocarbonetos monoterpênicos diminuíram com a hidrodestilação, para ambas as amostras (Tabelas 4 e 6). Reflexo da diminuição dos níveis de recuperação de  $\beta$ -mirceno e da não recuperação de  $\beta$ -pineno (PRAET et al. 2015), que são compostos voláteis.

Percebe-se que, as características do lúpulo *in natura* foram modificadas, impactando na diminuição do predomínio de sabor e odor picante em óleo hidrodestilado. Ou seja, o processo de hidrodestilação levou a uma mudança nas características aromática das amostras, como estudado por Praet et al. (2015). Entretanto, as características frutado, amadeirado e cítrico foram mantidas em níveis semelhantes aos dos lúpulos *in natura*.

Nos óleos obtidos pela hidrodestilação, foram identificados e separados novos compostos como a cetona dodecan-2-ona (São Paulo) sugerindo a transformação oxidativa de alguns compostos durante o processo de hidrodestilação (SALANTA et al., 2015). Já nas amostras de óleos de lúpulo de Minas Gerais foi identificado o hidrocarboneto sesquiterpeno  $\alpha$ -selineno (também não identificado por HS-SPME).

Todos os compostos identificados no lúpulo *in natura* de São Paulo foram extraídos na hidrodestilação, exceto o hidrocarboneto monoterpêneo  $\beta$ -pineno. Para amostras de Minas Gerais o hidrocarboneto monoterpêneo  $\beta$ -pineno e o hidrocarboneto sesquiterpeno *trans*- $\beta$ -cariofileno foram identificados apenas por HS-SPME, sugerindo também que estes compostos devem ter sofrido oxidação quando submetidos a temperaturas elevadas (SALANTA et al., 2015).

Comparando-se os perfis voláteis apresentados pelos extratos de lúpulo obtidos por SC com os perfis apresentados pelos lúpulos *in natura* (HS-SPME), percebe-se que a referida

extração foi seletiva a alguns compostos, de acordo com a condição de extração aplicada. De acordo com Opstaele et al. (2012), pressão e temperatura influenciam a densidade do solvente e a volatilidade do soluto, que definem o poder de solvatação e a seletividade do processo.

Dos compostos identificados por HS-SPME que foram isolados também na extração supercrítica, tem-se: para amostras de São Paulo, 80 bar e 40 °C e 80 bar e 60 °C extraíram apenas  $\alpha$ -selineno, que representa 5,26% dos compostos identificados no lúpulo *in natura*; para amostras de Minas Gerais, nestas mesmas condições de extração, extraiu  $\beta$ -mirceno e  $\alpha$ -selineno que representam 11,11% e dos compostos identificados no lúpulo *in natura*.

Por outro lado, a 80 bar, foram identificados compostos que não foram identificados por HS-SPME. Para os óleos de lúpulo de São Paulo consta o monoterpene oxigenado mentona e o éster decanoato de metila. Em óleos de Minas Gerais identificou-se (nas duas extrações realizadas): monoterpene oxigenado mentona; o éster decanoato de metila; o hidrocarboneto sesquiterpene e  $\alpha$ -selineno.

De acordo com a Figura 7, os extratos obtidos a 80 bar possuem perfis próximos, predominante frutado, floral, mentolado e picante, devido às características dos poucos componentes identificados. A presença significativa do composto mentona, que foi extraído em todas as condições de extrações supercríticas, atribuiu a característica mentolado que diferencia esses extratos dos demais. Os gráficos radar das extrações supercríticas a 110 bar não foram apresentados uma vez que não foi encontrado na literatura descrição quanto ao sabor e odor dos compostos majoritários identificados nestes extratos.

As extrações realizadas a 110 bar em amostras de São Paulo extraíram os mesmos compostos extraídos a 80 bar (mentona, decanoato de metila,  $\alpha$ -selineno e à 40 °C atractilona) além de outros compostos: o hidrocarboneto monoterpene  $\beta$ -mirceno, diterpene abietol, o monoterpene oxigenado trans-ferruginol, o fenoxinol tricosano e os hidrocarbonetos sesquiterpenos  $\beta$ -selineno e  $\alpha$ -selineno. Estes quatro últimos mencionados foram identificados em duplicata apenas nas extrações a 110 bar e 40 °C de lúpulo cultivado em São Paulo. Percebe-se que nesta pressão houve extração de compostos com tempos de retenções e, consequentemente, Índice de Kovats, elevados.

Já os compostos extraídos em duplicata nas extrações a 80 e 110 bar realizadas em amostras de Minas Gerais foram o hidrocarboneto monoterpene  $\beta$ -mirceno, o monoterpene oxigenado mentona e o éster decanoato de metila. À 80 bar extraiu-se o hidrocarboneto sesquiterpene  $\alpha$ -selineno que não foi extraído a 110 bar. Em contrapartida, a 110 bar, o diterpene abietol foi identificado em duplicata em ambas as temperaturas.

Um composto não identificado apresentou uma área significativa nos picos do cromatograma nas extrações a 110 bar, o que pode indicar a extração de compostos resinosos. Porém, segundo Vázquez-Araújo et al. (2013) óleos essenciais são solúveis em SC-CO<sub>2</sub> e, possivelmente, são mais facilmente extraídos do que as resinas, ou seja, eles podem contribuir mais significativamente aos extratos de lúpulo obtidos embora estes foram pouco detectados nos cromatogramas gerados por GC-MS.

O  $\beta$ -mirceno que consiste no principal composto de ambas as amostras não foi majoritário em nenhuma extração. Este composto pode ter oxidado ou evaporado durante os processos de extração ou até mesmo durante o armazenamento dos extratos, uma vez que é muito sensível a oxidação e é muito volátil (TYSKIEWICZ; KONKOL; RÓJ, 2018).

Cis- $\beta$ -farneseno que é predominante no lúpulo cultivado em São Paulo e em Minas Gerais só foi extraído em duplicata na hidrodestilação. Cis- $\beta$ -farneseno pertence ao grupo dos hidrocarbonetos sesquiterpenos que, de modo geral, foram extraídos em menores proporções nas extrações supercríticas que nas hidrodestilações. Isso pode ser atribuído à baixa solubilidade desses componentes, relativamente mais pesados em CO<sub>2</sub> supercrítico nas condições de teste atuais (ZARRINPASHNE; KANDI, 2018).

De modo geral, os hidrocarbonetos monoterpênicos estavam presentes em maiores proporções nos óleos hidrodestilados. Os monoterpênicos oxigenados apresentaram tendência oposta. Os óleos de SC, quando submetidos a pressão de 80 bar apresentaram proporções elevadas de mentona. Estas tendências também foram identificadas nos estudos de Reverchon e Senatore (1992) ao comparar as técnicas de hidrodestilação e extração com CO<sub>2</sub> supercrítico utilizando o alecrim como amostra.

## 5 CONCLUSÃO

O estudo indicou a nova variedade de lúpulo brasileiro Mantiqueira produzido no Brasil como um produto com potencial a ser comercializado no país, como um lúpulo aromático para produção de cervejas. Foram identificadas poucas diferenças entre lúpulos da mesma variedade cultivados na Serra da Mantiqueira, no estado de São Paulo e na região da Zona da Mata Mineira. Tais diferenças já eram esperadas devido às diferentes condições de cultivos entre as regiões.

Cada metodologia de extração revelou um perfil de compostos voláteis diferentes. A microextração em fase sólida modo *headspace* uma técnica empregada apenas para identificação de compostos, mas com baixo tempo de extração, baixa quantidade de amostra utilizada e grande quantidade de compostos identificados. Entretanto, não é uma técnica aplicável na produção de extratos comerciais.

A hidrodestilação apresentou-se como uma metodologia pouco aplicável, por apresentar um rendimento muito inferior ao esperado. Por outro lado, os perfis de voláteis indicaram semelhanças consideráveis com os perfis dos lúpulos *in natura*.

A condição de extração supercrítica, 110 bar e 40 °C foi a que apresentou maiores rendimentos. Entretanto, pode ter ocorrido a extração de outros compostos que não são óleos essenciais, sendo o rendimento, portanto, um dado pouco conclusivo.

A extração supercrítica, porém, indicou uma seletividade muito grande para uma gama muito pequena de compostos, indicando que outras condições de extração devem ser estudadas para otimizar essas condições. Os perfis de voláteis de óleos provenientes dessa extração apresentaram-se muito diferentes dos perfis de voláteis de lúpulo *in natura*, levando a conclusão de que alguns compostos não foram extraídos ou foram transformados em outros compostos, ou ainda, foram perdidos na etapa de armazenamento até a sua análise. A extração de resinas também pode ser considerada.

Tendo em vista as grandes vantagens apresentadas pelo método de extração supercrítica, uma otimização das condições de extração deve ser realizada a fim de isolar uma gama maior de compostos, capaz de tornar as características sensoriais do extrato mais próximo do lúpulo *in natura*.

Lúpulo *in natura* confere aromas e odores frutado, amadeirado, picante e cítrico. Extratos hidrodestilados também proporcionam as mesmas notas amadeirados, picantes, cítricos e frutados. Enquanto extratos obtidos por extração supercrítica são predominantemente frutado, floral, mentolado e picante

Portanto, a variedade Mantiqueira tem aplicação comercial podendo ser utilizada, tanto em sua forma natural, quanto em forma de extratos, nas etapas de fabricação da cerveja para conferir atributos sensoriais ao produto.

## BIBLIOGRAFIA

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry. **Allured Pub**, Londres, 2007.

ALMAGUER, C.; SCHONBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. Humulus lupulus – a story that beags to be told. **Journal of the Institute of Brewing diverso Distilling**, v. 120, p. 289-314, 2014.

BARTH, S. J.; BARTH, R.; BARTH, A. W. **Hops 2017-2018**. Barth-Hass group, 2018.

BARTH-HAAS GROUP. **The new Barth Report Hops 2018/2019**. Disponível em: <<https://www.barthaas.com/en/news/the-new-barth-report-hops-2018-2019-has-been-published>>. Acesso em: 04 mai, 2020.

BECKER, H.; GERHAUSER, C.; BOHR, G. Acylphoroglucinol derivatives from hops as anti-inflammatory agentes. **Beer in Health Disease Prevention, Elsevier**, Londres, p. 753-757, 2009.

BRASIL. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009**. Padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Brasília, DF: Presidência da República, [2017]. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm)>. Acesso em: 30 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário da cerveja: 2019. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: **MAPA/SDA**, 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/anuario-da-cerveja-2019>>. Acesso em: 04 mai. 2020.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing science and practice**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2000.

CABALLERO, I.; BLANCO, C. A.; PORRAS, M. Iso- $\alpha$ -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, n.1, p. 21-30, jul. 2012.

CERVIERI JÚNIOR, O.; TEIXEIRA JÚNIOR, J. R.; GALINARI, R.; RAWET, E. L.; SILVEIRA, C. T. J. O setor de bebidas no Brasil. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 40, p. 93-129, 2014.

COSTA, E. R. C. A bebida de Ninkasi em terras tupiniquins: o mercado da cerveja e o turismo cervejeiro no Brasil. **Revista Iberoamericana e Turismo**, v. 5, n.1, p. 22-41, 2015.

DEREK, R. J. L.; NIGEL, A. B.; JOHN, A. P. Production of Solvent-Free Isomerized Extracts. **Brewing Research Foundation**, v. 35, p. 187-191, 1977.

DE VOS, D.; MERTENS, P. **Method for isomerization of hop alpha-acids to iso-alpha-acids**. Estados Unidos US9909088B2. 2018.

DRAGONE, G.; MUSSATI, S.I.; SILVA, J.B.A. Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 27, p. 37-40, 2007.

DRESEL, M.; VOGT, C.; DUNKEL, A.; HOFMANN, T. The bitter chemodiversity of hops (*Humulus lupulus* L.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 41, p. 7789-7799, 2016.

EYRES, G.; DUFOUR, J. Hop Essential Oil: analysis, chemical composition and odor characteristics. **Beer in Health and Disease Prevention**, p. 239-254, 2009.

FAO- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Countries by commodity, hops, 2018**. Disponível em: <[http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities\\_by\\_country\\_exports](http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_country_exports)>. Acesso em: 04 mai. 2020.

FIELD, J. A.; NICKERSON, G.; JAMES, D. D.; HEIDER, C. Determination of Essential Oils in Hops by Headspace Solid-Phase Microextraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1768-1772, 1996.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcólicas, Ciência e Tecnologia**. 2. ed. São Paulo: Blucher, 2016.

GARCIA, L.; CHAGAS, E. Lúpulo, crescendo muito bem no Brasil. **Revista da Cerveja**, São Paulo, n. 36, set-out, 2018.

GARDELI, C.; PAPAGEORGIOU, V.; MALLOUCHOS, A.; THEODOSIS, K.; KOMAITIS, M. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.: Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts. **Food Chemistry**, v.107, p. 1120–1130, 2008.

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

GUZINSKI, J. A.; SCHULZE, M. H. **Readily-dispersible lipidic hop extract for imparting hoppy aroma and flavor to beer**. US6242038B1. Depósito: 13 set. 1994. Concessão: 18 nov. 1997.

HIERONYMUS, S. For the love of hops, The practical guide to Aroma, bitterness and the culture of hops. **Brewers Publications**, 2012.

KARABÍN, M.; HUDCOVÁ, T.; JELÍNEK, L.; DOSLÁLEK, P. Biologically active compounds from hops and prospects for their use. **Food Science and Food Safety**, v. 15, n.3, p. 542-567, 2016.

KATONO F.; YONEZAWA, F.; INUI, T. Hop extract and method for producing same. Estados Unidos US20180119072A1. 2018.

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

KROFTA, K.; NESVADBA, V. Utilisation Of Solid-Phase Microextraction In Hop Oil Analyses. **Acta Horticulturae**, v. 668, p. 191-200, 2005.

KORFTA K. Comparison of quality parameters of Czech and foreign hop varieties. **Plant, Soil and Environment**, v. 49, p. 261–268, 2003.

KUPSKI, S. C.; KLEIN, E. J.; SILVA, E. A.; PALÚ, F.; GUIRARDELLO, R.; VIERA, M. G. A. Mathematical modeling of supercritical CO<sub>2</sub> extraction of hops (*Humulus Lupulus* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, p. 347-356, 2017.

LAWS, D. R.; BATH, N. A.; PICKET, J. A. Preparation of hop extracts without using organic solvents. **Journal of Institute Brewing**, v. 83, p. 39-40, 1977.

LERMUSIEAU, G.; COLLIN, S. Hop Aroma Extraction and Analysis. **Analysis of Taste and Aroma**, Berlim, v. 21, p. 69-88, 2002.

LIU, Z.; WANG, L.; LIU, Y. Rapid differentiation of Chinese hop varieties (*Humulus lupulus*) using volatile fingerprinting by HS-SPME-GC-MS combined with multivariate statistical analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 10, p. 3758–3766, 2018.

MARCUSSO, E. F.; MÜLLER, C. V. **A cerveja no Brasil: o ministério da agricultura informando e esclarecendo**. Ministério da Agricultura, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pastapublicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf>> Acesso em: 10 mai. 2020.

MEUSSDOERFFER, F. G. **A Comprehensive History of Beer Brewing. Handbook of Brewing: Processes**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2009.

MARRIOTT, R. **Fractionation of hop oils using liquid and supercritical carbon dioxide**. NATURAL SOLUTIONS LTD TOTALLY, EP3063260A1, 2019.

OLADOKUN, O.; JAMES, S.; COWLEY, T.; SMART, K.; HORT, J.; COOK, D. Dry-Hopping: the effects of temperature and hop variety on the bittering profiles and properties of resultant beers. **BrewingScience**, v. 70, 2017.

OLSOVSKA, J.; BOSTIKOVA, V.; DUSEK, M.; JANDOVSKA, V.; BOGDANOVA, K.; CERMAK, P.; BOSTIK, P.; MIKYSKA, A.; KOLAR, M. *Humulus lupulus* l. (hops) – a valuable source of compounds with bioactive effects for future therapies. **Military Medical Science Letters**, v. 85, n. 1, p. 19-30, 2016.

PALAMAND, S. R.; ALDENHOFF, J. M. Bitter Tasting Compounds of Beer. Chemistry and Taste Properties of Some Hop Resin Compounds. **Journal of Institute Brewing**, Londres, v. 76, n. 25, p. 536-543, 1970.

PINHEIRO, P. F., COSTA, A. V., ALVES, T. D. A., GALTER, I. N., PINHEIRO, C. A., PEREIRA, A. F., OLIVEIRA, C. M. R.; FONTES, M. M. P. Phytotoxicity and cytotoxicity of

essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol and thymol in plant bioassays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n.41, p. 8981-8990, 2015.

PRIEST, F. G. AND STEWART, G. G. Handbook of Brewing. **CRC Press**, 2. ed., 2006.

PFAF-SOVLJANSKI, I. I.; GRUJIĆ, O. S. PERUNIČIĆ, M. B.; CVETKOVIĆ, I. M.; ZEKOVIĆ, Z. P. Supercritical Carbon Dioxide Hop Extraction. **Acta Periodica Technologica**, p. 111-122, 2005.

RODRIGUES, M. A.; MORAIS, J. S.; CASTRO, J. P. M. **Jornada de lúpulo e cerveja. Novas oportunidades de negócio**. Bragança: Instituto Politécnico de Bragança; 2015.

RYBKA, A.; KORFTA, K.; HEŘMÁNEK P.; POKORNÝ, J. Effect of drying temperature on the content and composition of hop oils. **Plant, Soil and Environment**, v. 64, n. 10, p. 512 – 516, 2018.

SALANTA, L. C.; TOFANA, M.; SOCACI, S.; MUDURA, E.; POP, C.; POP, A.; FARCAS, A. Determination of Volatiles in Hops from Romania by Solid Phase Fiber Microextraction and Gas Chromatography – Mass Spectrometry. **Analytical Letters**, 2015.

SCHONBERGER, C.; KOSTELECKY, T. Review: The role of hops in brewing. **Journal of the institute of brewing**, v. 117, n. 3, p. 259-267, 2011.

SHARP, D. C.; QIAN, Y.; CLAWSON, J.; SHELLHAMMER, T. H. Comparison of the Contributions of Hop Pellets, Supercritical Fluid Hop Extracts, and Extracted Hop Material to the Hop Aroma and Terpenoid Content of Kettle-Hopped Lager Beers. **Master Brewers Association TQ**, Estados Unidos, v. 54, n. 1, 2017.

SMITH, J. M.; VAN NESS, H. C.; ABBOTT, M. M. Introdução à termodinâmica da engenharia química. Rio de Janeiro: LTC, 7. Ed., 2007.

STEENACKERS, B.; COOMAN, L.; VOS, D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: a review. **Food Chemistry**, v. 172, p. 742-756, 2015.

STRONG, G.; ENGLAND, K. **Beer Style guidelines**. BJCP, 2015. Disponível em: <<http://www.bjcp.org/stylecenter.php>>. Acesso em: 10 mai. 2020.

TAKOI, K.; ITOGA, Y.; KOIE, K.; KOSUGI, T.; KATAYAMA, Y.; NAKAYAMA, Y.; WATARI, J. The contribution of geraniol metabolism to the citrus flavour of beer: synergy of geraniol and  $\beta$ -citronellol under coexistence with excesso linalool. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, n. 3, p. 251-260, 2010.

TYSKIEWICZ, K.; KONKOL, M.; RÓJ, E. The application of supercritical fluid extraction in phenolic compounds isolation from natural plant materials. **Molecules**, v. 23, p. 2625, 2018.

LAWS, D. R.; BATH, N. A.; ENNIS, C. S.; WHELDON, A. G. **Hop extraction with carbon dioxide**. Estados Unidos, US3979527A, 19 ago. 1980.

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

OPSTAELE, F. V.; GOIRIS, K.; DE ROUCK, G.; AERTS, G.; DE COOMAN, L. Production of novel varietal hop aromas by supercritical fluid extraction of hop pellets - Part 2: Preparation of single variety floral, citrus, and spicy hop oil essences by density programmed supercritical fluid extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 147–161, 2012.

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

VERZELE, M.; ANTEUNIS, M.; ALDERWEIRELDT, F. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 71, p. 232, 1965.

YAHIRO, K.; SHIRASAKA, D.; TAGASHIRA, M.; WADA, A.; MORINAGA, N.; KURODA, F.; CHOI, O.; INOUE, M.; AOYAMA, N.; IKEDA, M.; HIRAYAMA, T.; MOSS, J.; NODA, M. Inhibitory effects of polyphenols on gastric injury by *Helicobacter pylori* VacA toxin. **Helicobacter**, v.10, n. 3, p. 231, 2005.

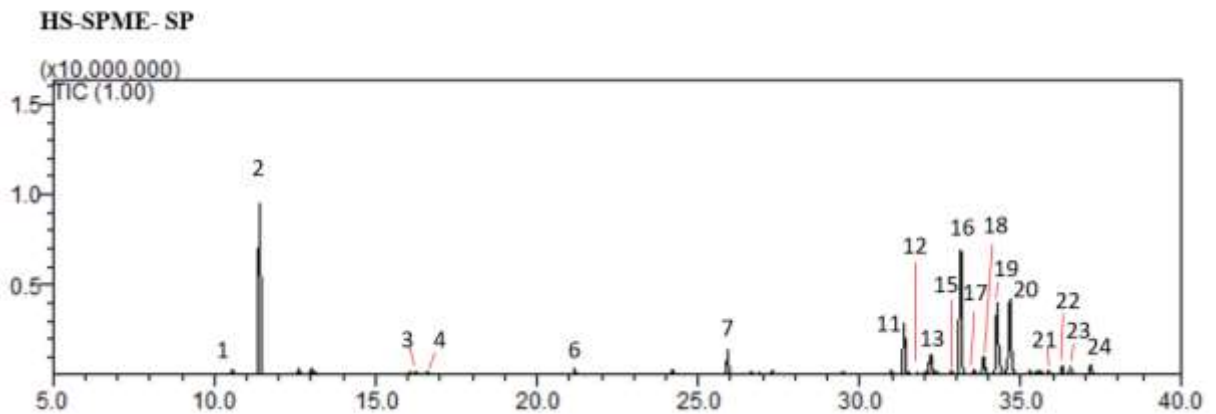
WANG, X.; YANG, L.; YANG, X.; TIAN, Y. In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1693-1700, 2014.

ZARRINPASHNE, S.; KANDI, S. G. A study on the extraction of essential oil of Persian black cummin using static supercritical CO<sub>2</sub> extraction, and comparison with hydro-distillation extraction method. **Separation Science and Technology**, v. 54, n. 11, p. 1-9, 2018.

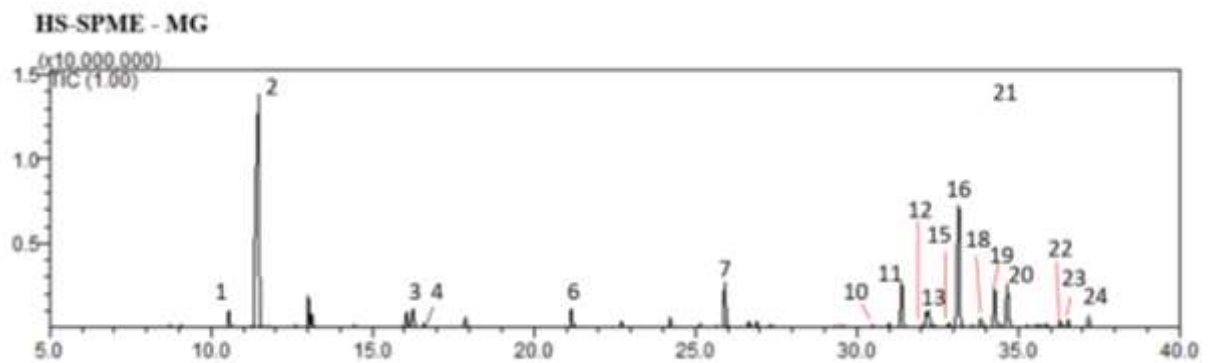
ZEKOVIC, Z.; PFAF-SOVLJANSKI, I.; GRUJIC, O. Supercritical fluid extraction of hops. **Journal of the Serbian Chemical Society**, n. 72, p. 81–87, 2007.

## ANEXO

Anexo A- Cromatogramas gerados por GC-MS para amostras de lúpulos *in natura* de São Paulo e Minas Gerais após técnica de HS-SPME.

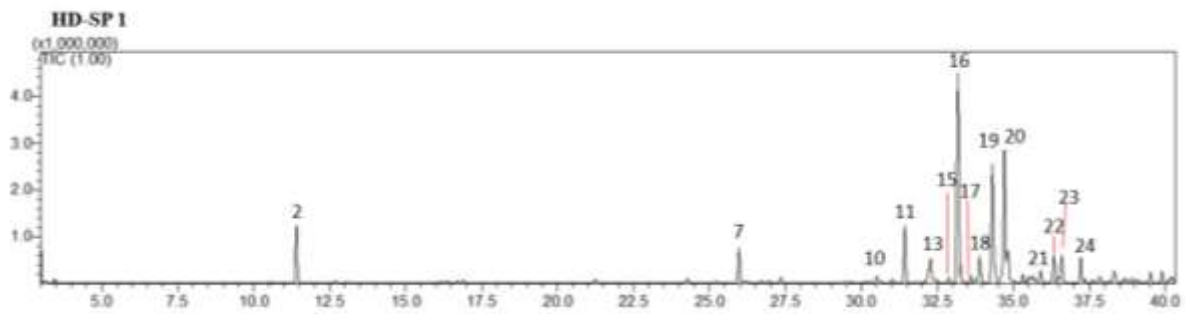


**Figura A1-** Cromatograma obtido por GC-MS após HS-SPME de lúpulo cultivado em São Paulo. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.

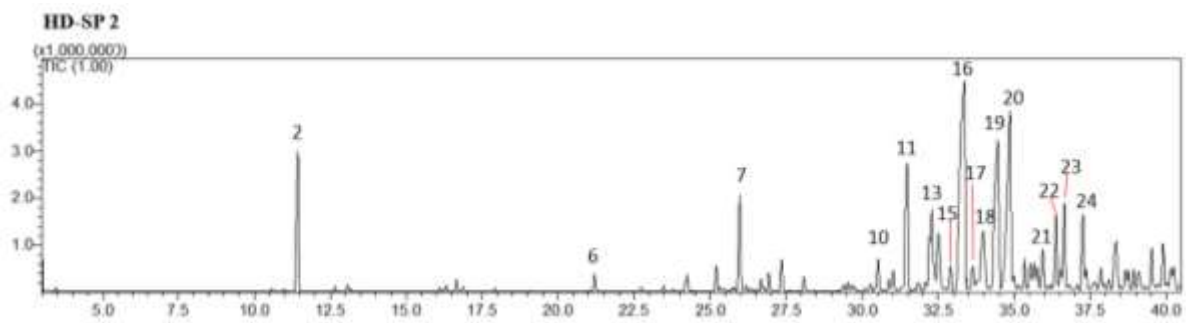


**Figura A2-** Cromatograma obtido por GC-MS após HS-SPME de lúpulo cultivado em Minas Gerais. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.

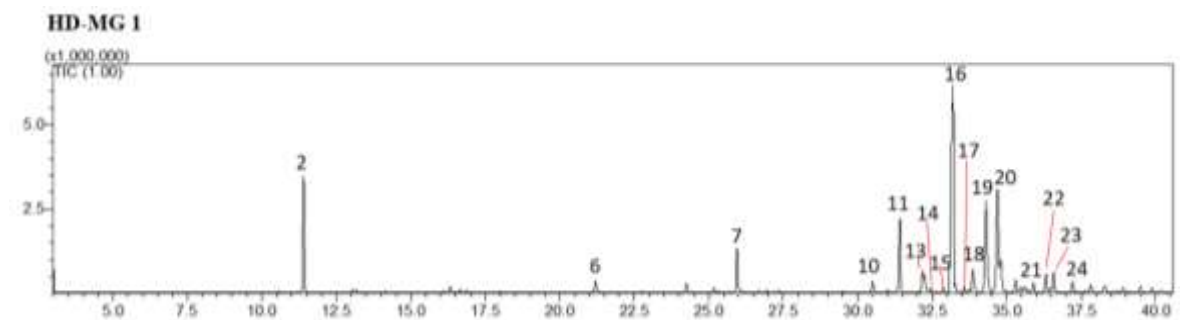
**Anexo B- Cromatogramas gerados por GC-MS para extratos de lúpulos de São Paulo e Minas Gerais após técnica de hidrodestilação.**



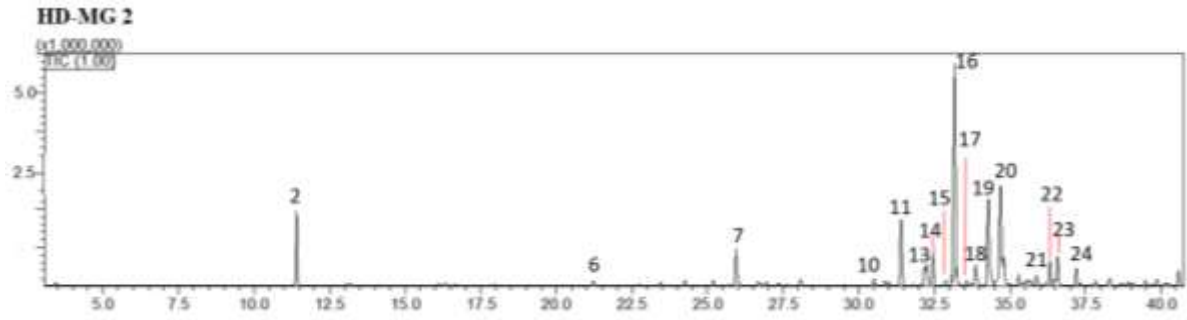
**Figura B1-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato hidrodestilado de lúpulo cultivado em São Paulo. Amostra 1. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



**Figura B2-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato hidrodestilado de lúpulo cultivado em São Paulo. Amostra 2. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.

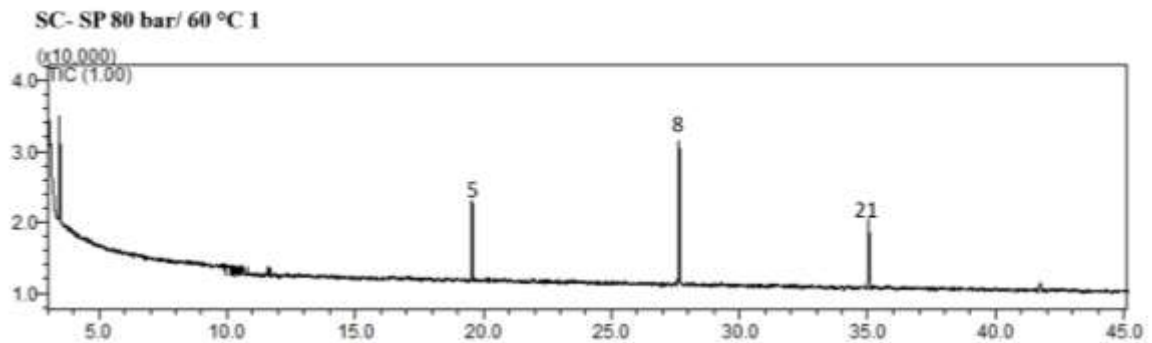


**Figura B3-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato hidrodestilado de lúpulo cultivado em Minas Gerais. Amostra 1. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.

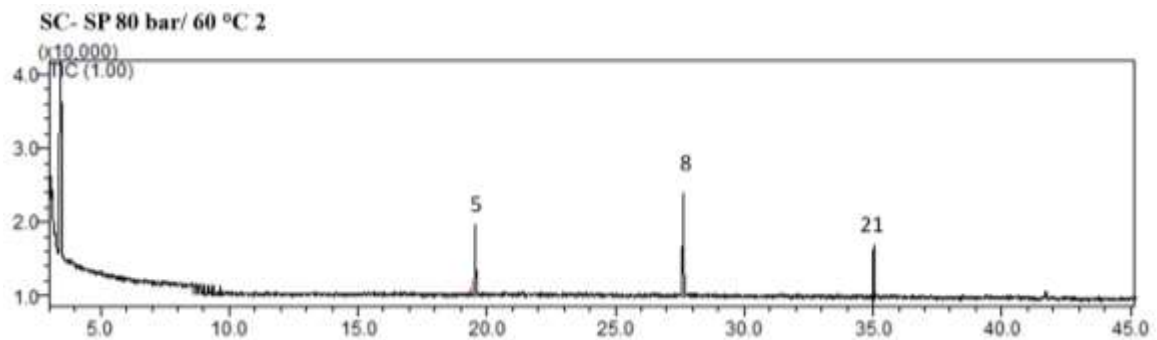


**Figura B4-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato hidrodestilado de lúpulo cultivado em Minas Gerais. Amostra 2. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.

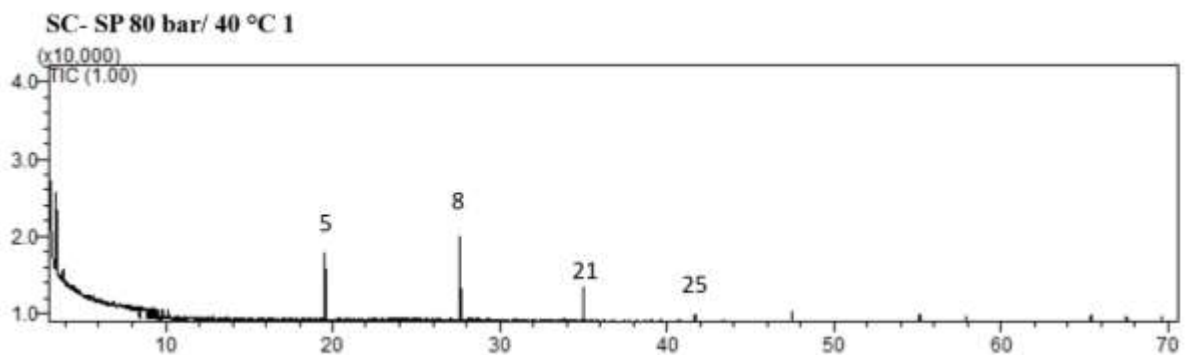
**Anexo C- Cromatogramas gerados por GC-MS para extratos obtidos por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de lúpulos cultivados em São Paulo.**



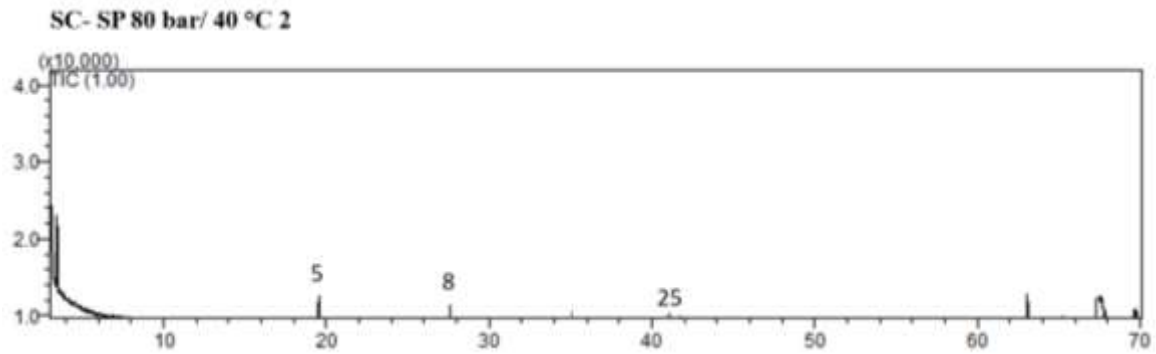
**Figura C1-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em São Paulo após extração com dióxido de carbono supercrítico a 80 bar e 60 °C. Amostra 1. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



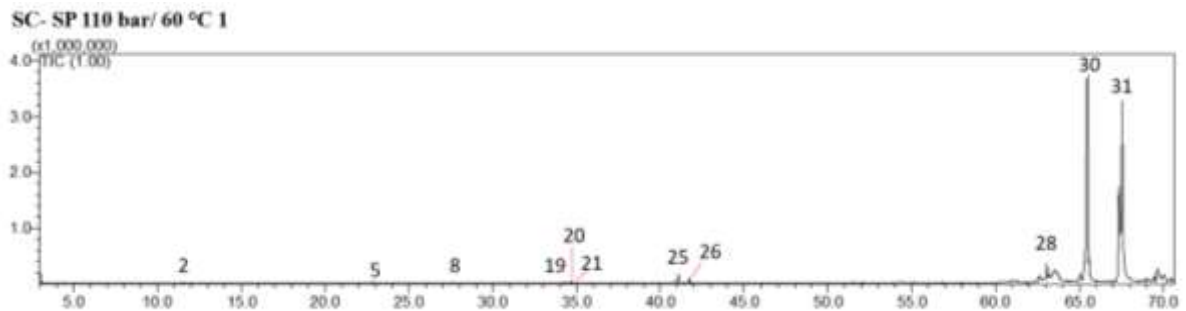
**Figura C2-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em São Paulo após extração com dióxido de carbono supercrítico a 80 bar e 60 °C. Amostra 2. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



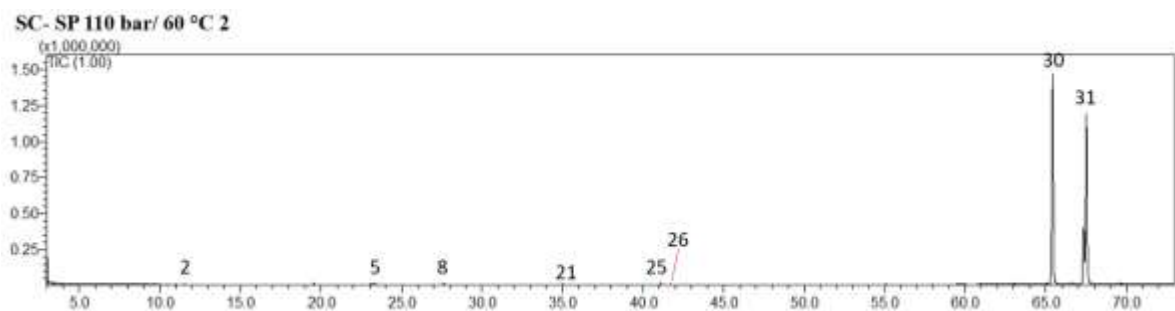
**Figura C3-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em São Paulo após extração com dióxido de carbono supercrítico a 80 bar e 40 °C. Amostra 1. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



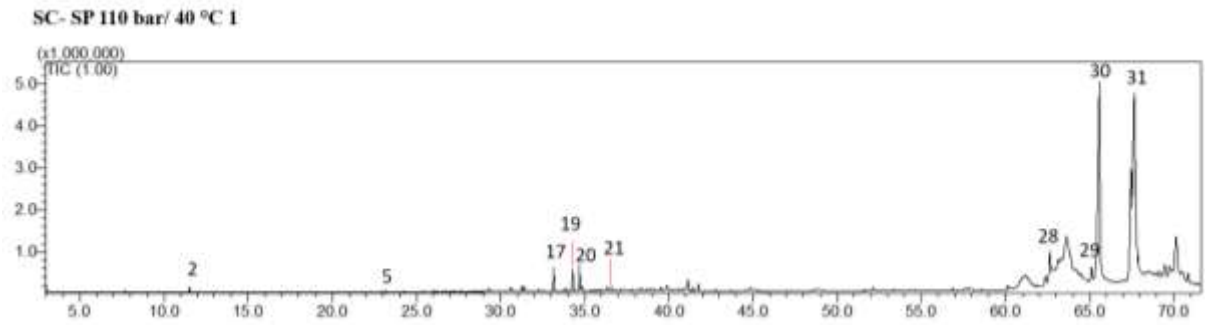
**Figura C4-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em São Paulo após extração com dióxido de carbono supercrítico a 80 bar e 40 °C. Amostra 2. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



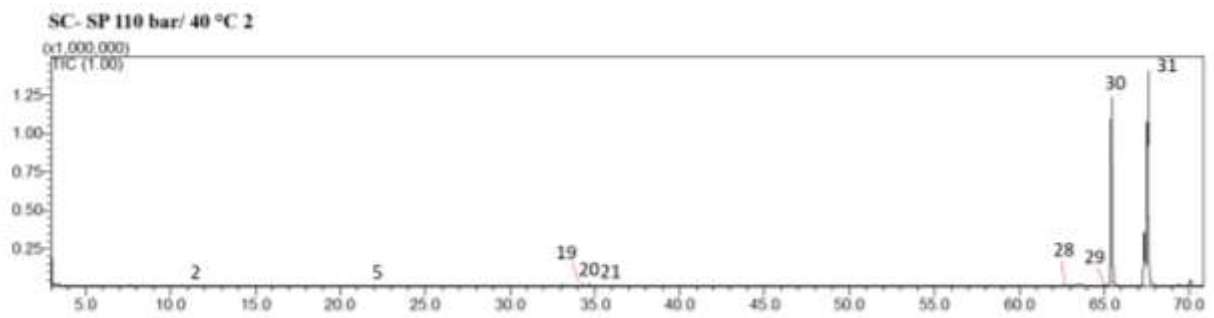
**Figura C5-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em São Paulo após extração com dióxido de carbono supercrítico a 110 bar e 60 °C. Amostra 1. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



**Figura C6-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em São Paulo após extração com dióxido de carbono supercrítico a 110 bar e 60 °C. Amostra 2. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



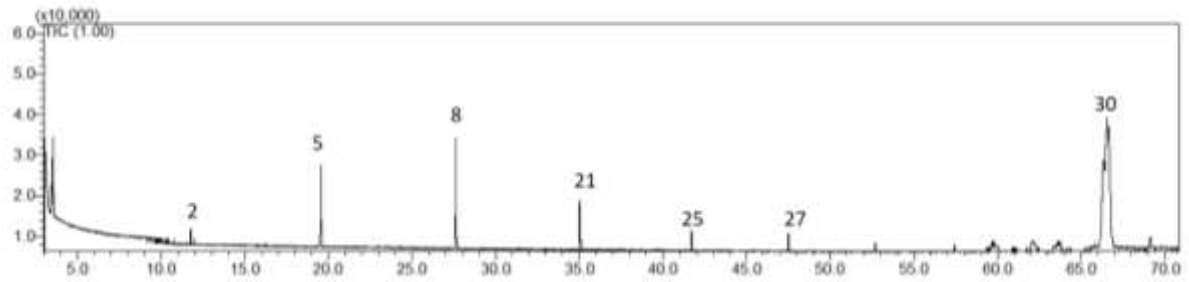
**Figura C7-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em São Paulo após extração com dióxido de carbono supercrítico a 110 bar e 40 °C. Amostra 1. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



**Figura C8-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em São Paulo após extração com dióxido de carbono supercrítico a 110 bar e 40 °C. Amostra 2. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.

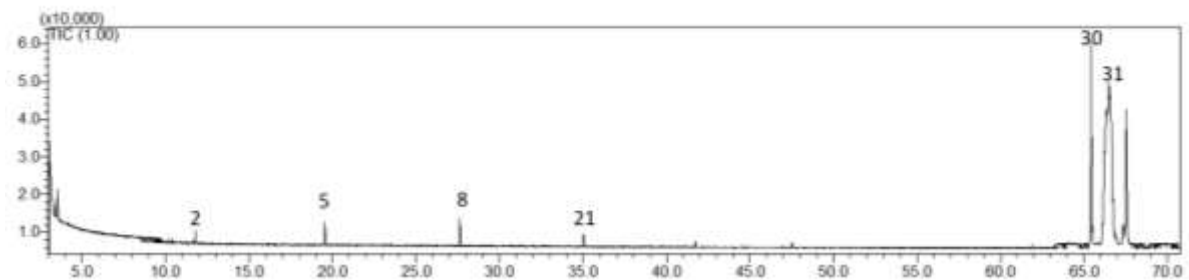
**Anexo D- Cromatogramas gerados por GC-MS para extratos obtidos por extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de lúpulos cultivados em Minas Gerais.**

SC- MG 80 bar/ 60 °C 1



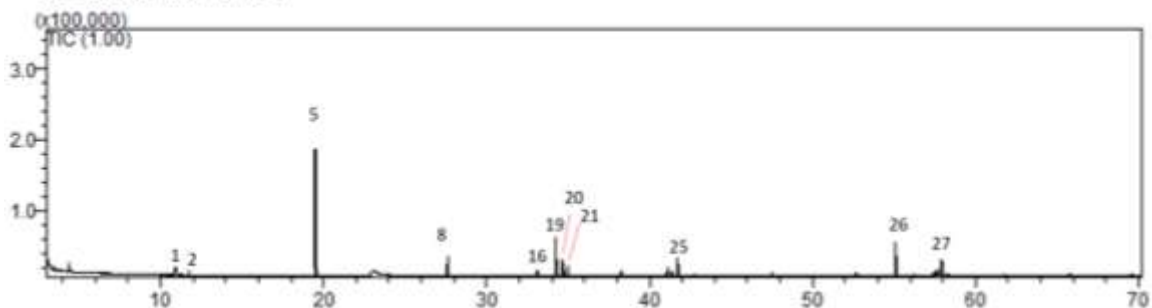
**Figura D1-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em Minas Gerais após extração com dióxido de carbono supercrítico a 80 bar e 60 °C. Amostra 1. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.

SC- MG 80 bar/ 60 °C 2

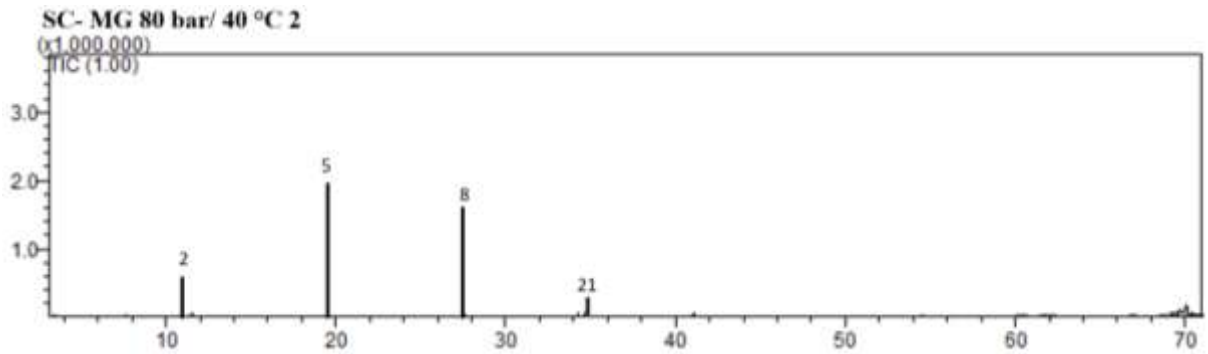


**Figura D2-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em Minas Gerais após extração com dióxido de carbono supercrítico a 80 bar e 60 °C. Amostra 2. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.

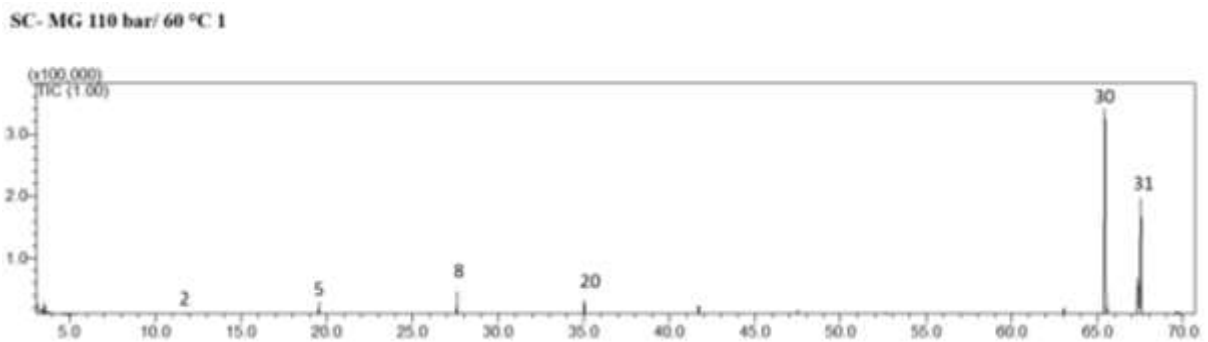
SC- MG 80 bar/ 40 °C 1



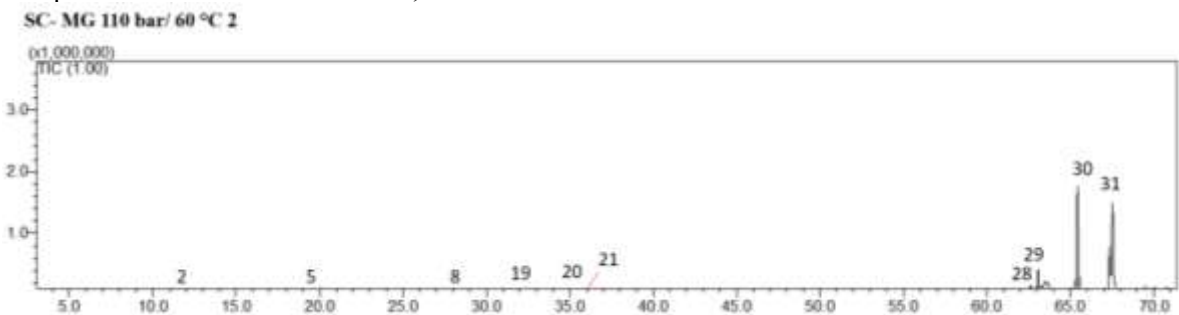
**Figura D3-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em Minas Gerais após extração com dióxido de carbono supercrítico a 80 bar e 40 °C. Amostra 1. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



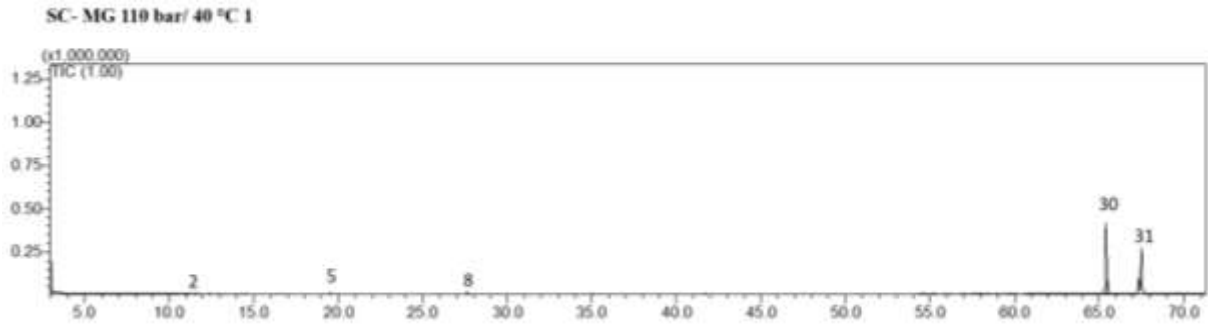
**Figura D4-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em Minas Gerais após extração com dióxido de carbono supercrítico a 80 bar e 40 °C. Amostra 2. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



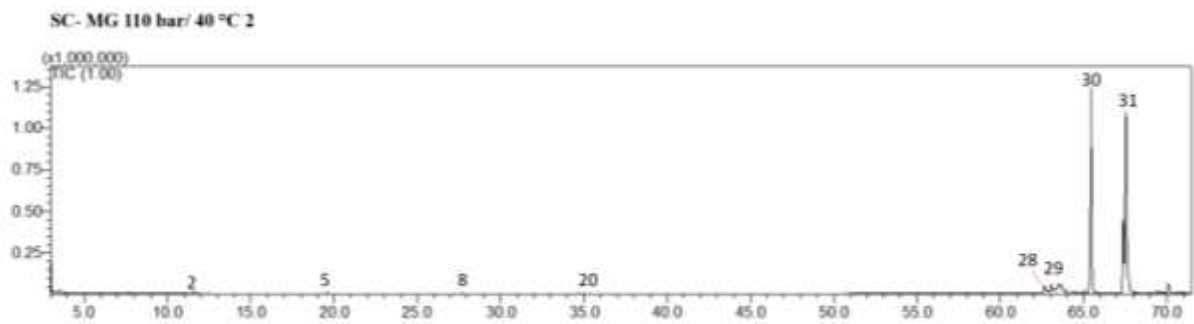
**Figura D5-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em Minas Gerais após extração com dióxido de carbono supercrítico a 110 bar e 60 °C. Amostra 1. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



**Figura D6-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em Minas Gerais após extração com dióxido de carbono supercrítico a 110 bar e 60 °C. Amostra 2. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



**Figura D7-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em Minas Gerais após extração com dióxido de carbono supercrítico a 110 bar e 40 °C. Amostra 1. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.



**Figura D8-** Cromatograma obtido por GC-MS de extrato de lúpulo cultivado em Minas Gerais após extração com dióxido de carbono supercrítico a 110 bar e 40 °C. Amostra 2. Números referentes aos compostos indicados nas Tabelas 2, 9 e 10.