**Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos**

Renato da Silva Durello

Química do sabor de cervejas: detalhes moleculares de lúpulos (*Humulus lupulus*) cultivados no Brasil no processo cervejeiro

Orientador: Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior

São Carlos

2019

Renato da Silva Durello

Química do sabor de cervejas: detalhes moleculares de lúpulos (*Humulus lupulus*) cultivados no Brasil no processo cervejeiro

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica.

Orientador: Prof. Dr. Stanislau Bogusz Junior.

São Carlos

2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família pelo apoio.

Ao meu orientador Prof. Stanislau Bogusz Junior pelos ensinamentos e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus companheiros de laboratório pela colaboração.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (processo nº 131713/2018-3) pela bolsa fornecida.

“Ele era um homem sábio, aquele que inventou a cerveja.” (Platão).

RESUMO

Nesta pesquisa foi investigada, pela primeira vez, a composição química de lúpulos cultivados no Brasil para a produção de cervejas artesanais. Para isso, foram analisadas 10 amostras de lúpulos das variedades Cascade, Columbus, Chinook e Hallertauer, cultivados em diferentes regiões do Brasil (Minas Gerais, Paraná e Rio Grande do Sul). Quando foram comparadas as composições químicas dos lúpulos cultivados no Brasil com as dos lúpulos comerciais produzidos em outros países, verificou-se que os lúpulos da variedade Cascade produzidos em Bueno Brandão – MG e Araxá – MG foram os que apresentaram maiores similaridades ao produto comercial em termos de óleo essencial e ácidos amargos. O Cascade de Araxá – MG foi selecionado para fabricação de uma cerveja artesanal e apresentou teores de humulonas e lupulonas de 4,31% e 2,90%, respectivamente. Quanto ao teor de óleo essencial, o Cascade nacional apresentou um rendimento de 1,18% (mL/100g ou %v/m). Os principais constituintes do óleo essencial deste lúpulo foram: mirceno (59%), 2-metilbutil isobutirato (0,7%), linalol (0,5%), β -cariofileno (4%), α -humuleno (15%) e α -farneseno (1%). Após esta triagem, foi também fabricada uma cerveja artesanal com o lúpulo Cascade comercial (controle), a fim de comparar o efeito da origem do lúpulo na composição química de voláteis nas cervejas produzidas. Além disso, também foi investigado o efeito da adição da enzima β -glicosidase (CE número: 3.2.1.21) na liberação de voláteis terpênicos a partir de terpenos glicosilados do lúpulo para as cervejas. Na análise dos voláteis da cerveja foi otimizada, por metodologia de superfície de resposta, a etapa de extração dos voláteis empregando micro-extração em fase sólida de headspace (HS-SPME). As condições mais próximas do ponto ótimo de extração foram: fibra CAR/DVB/PDMS, temperatura de extração de 75 °C por 121 minutos. As cervejas produzidas apresentaram diferenças na composição dos seus voláteis por HS-SPME e GC-MS. Aquelas cervejas elaboradas com enzima apresentaram alguns voláteis mais intensos que as elaboradas sem enzima β -glicosidase, o que sugere a existência de terpenos glicosilados nos lúpulos utilizados.

ABSTRACT

In this research the chemical composition of Cascade, Columbus, Chinook and Hallertauer hops, cultivated in different regions of Brazil (Minas Gerais, Paraná and Rio Grande do Sul) are being investigated for the first time. When comparing the chemical compositions of Brazilian one with commercial ones produced in other countries, Cascade variety produced in Bueno Brandão (MG) and Araxá city (MG) were the ones that presented greater similarities to the commercial product in terms of essential oil and bitter acids. Cascade Araxá (MG) was selected for the production of a craft beer and presented levels of humulones and lupulones of 4.31% and 2.90%, respectively. Regarding the essential oil contents, the Cascade cultivated in Brazil showed a yield of 1.18% (mL/100g or %v/m). The main constituents of the essential oil of this hop were: mycene (59%), 2-methylbutyl isobutyrate (0.7%), linalool (0.5%), β -caryophyllene (4%), α -humulene (15%) and α -farnesene (1%). After this screening, a craft beer with commercial Cascade hop (control) was also manufactured in order to compare the effect of hop origin on the chemical composition of volatiles in the beers produced. Moreover, the effect of β -glucosidase, an enzyme which catalyzes the hydrolysis of terminal non-reducing residues in β -glucosidase (EC number: 3.2.1.21), on the release of hop volatiles compounds (from glycoside terpenes) to beers was also investigated. In the analysis of the beer volatile compounds, the extraction step by headspace solid phase microextraction (HS-SPME) was optimized by the response surface methodology. The conditions closest to the optimum extraction point were: CAR/DVB/PDMS fiber and extraction temperature 75 °C for 121 minutes. The produced beers showed different volatile compounds compositions. Those beers made with enzyme presented some more intense volatiles than those prepared without β -glucosidase enzyme, which can be explained by the greater amount of certain terpenes in these beers, suggesting the existence of glycosylated terpenes in the hops used.

Lista de Figuras

Figura 1: Flor de lúpulo seccionada com destaque para suas principais estruturas morfológicas.....	12
Figura 2: Nomenclatura e principais constituintes das frações do lúpulo segundo fracionamento obtido pelo protocolo de Wöllmer modificado.....	16
Figura 3: Estruturas químicas dos principais α -ácidos (humulonas) do lúpulo	17
Figura 4: Reações de isomerização da humulona em iso-humulonas (mais amargas e mais hidrossolúveis) durante o processo de fervura do mosto.....	19
Figura 5: Reações de oxidação e conversão fotoquímica da humulona.....	20
Figura 6: Formação do 3-metil-2-buten-1-ol (MBT) a partir da iso-humulona por fotodegradação.....	21
Figura 7: Estruturas químicas dos principais β -ácidos (lupulonas) do lúpulo.....	22
Figura 8: Via biossintética de formação de humulonas e lupulonas em lúpulo.....	24
Figura 9: Principais prenilflavonoides presentes na resina dura- β do lúpulo.....	26
Figura 10: Mecanismo de conversão térmica do xanthohumol em iso-xantohumol.....	27
Figura 11: Estruturas químicas de huluponas e do ácido hulupínico.....	28
Figura 12: Resumo da via biossintética de flavonoides do lúpulo.....	31
Figura 13: Estruturas químicas de alguns dos principais flavonoides do lúpulo.....	32
Figura 14: Estruturas químicas de alguns flavan-3-óis e taninos do lúpulo.....	33
Figura 15: Estruturas químicas de alguns ácidos fenólicos do lúpulo.....	34
Figura 16: Estruturas químicas dos multifidois glicosilados do lúpulo.....	35
Figura 17: Estruturas químicas de alguns dos principais estilbenos do lúpulo.....	35
Figura 18: Resumo da via biossintética de formação de terpenoides do lúpulo.....	37
Figura 19: Estruturas químicas e quantidades (%) para os principais hidrocarbonetos encontrados nos óleos essenciais do lúpulo.....	39
Figura 20: Estruturas químicas e quantidade (%) para alguns compostos oxigenados encontrados nos óleos essenciais do lúpulo.....	41
Figura 21: Estruturas químicas dos derivados dos α -ácidos: hexahidro-isohumulona, tetrahydro-isohumulona, rho-isohumulona e isohumulona.....	49
Figura 22: Curva de mostura empregada no preparo das cervejas artesanais.....	52
Figura 23: Cromatograma típico da análise de α e β -ácidos do lúpulo por HPLC obtido em nosso laboratório. Da esquerda para direita: cohumulona, n-+adhumulona, colupulona e n-+adlupulona.....	56

Figura 24: Resultados de rendimento de extração de óleos essenciais (% v/m) para os lúpulos cultivados no Brasil. Valores expressos para 10% de umidade.....	59
Figura 25: Cromatogramas dos óleos essenciais dos lúpulos Cascade selecionados para fabricação da cerveja, obtidos por GC-MS. Em destaque: 1= mirceno, 2= 2-metilbutil isobutirato 3= linalol, 4= geraniol, 5= β -cariofileno, 6= α -humuleno e 7= α -farneseno.....	61
Figura 26: Cromatograma dos voláteis de uma cerveja artesanal comercial obtido por HS-SPME e GC-MS.....	65
Figura 27: Capacidade de extração dos voláteis da cerveja artesanal comercial utilizando diferentes fibras de SPME e GC-MS.....	66
Figura 28: Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis do planejamento fracionário para extração de voláteis em cerveja por HS-SPME. Resposta: área total, erro puro = 3,943E+15.....	67
Figura 29: Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis do planejamento completo 22 para extração de voláteis em cerveja por HS-SPME. Resposta: área total, 2 fatores, 1 bloco, erro puro = 6,207E+15.....	68
Figura 30: Superfície de resposta e gráfico de contorno para a otimização dos parâmetros tempo (min) e temperatura (°C) de extração dos voláteis da cerveja por HS-SPME.....	70
Figura 31: Representação da β -D-glicose com uma aglicona em C1.....	76

Lista de Tabelas

Tabela 1: Principais constituintes encontrados em flores secas de lúpulo.....	14
Tabela 2: Compostos de amargor, limiar de percepção sensorial e concentração normalmente encontrada em cervejas tipo <i>Lager</i>	45
Tabela 3: Compostos voláteis, limiar de percepção sensorial, concentração e descritor de aroma em cerveja.....	47
Tabela 4: Código, variedade e local de cultivo das amostras de lúpulo investigadas.....	51
Tabela 5a: Teores de umidade para os diferentes lúpulos investigados.....	57
Tabela 5b: Teores de α -ácidos e β -ácidos para os diferentes lúpulos. Valores expressos para 10% de umidade.....	58
Tabela 6: Teores de ácidos amargos nos lúpulos selecionados para a fabricação da cerveja artesanal. Valores expressos para 10% de umidade.....	60
Tabela 7: Rendimento de óleo essencial nos lúpulos selecionados para a fabricação da cerveja artesanal. Valores expressos para 10% de umidade.....	60
Tabela 8: Caracterização e semi-quantificação dos óleos essenciais dos lúpulos Cascade - Brasil e Cascade - EUA, obtidas por GC-MS e GC-FID (% de área relativa)	61
Tabela 9: Planejamento fracionário $2^{(4-1)}$ para triagem de variáveis que afetam a extração de voláteis da cerveja por HS-SPME.....	67
Tabela 10: Planejamento completo 2^2 para otimização da extração dos voláteis da cerveja por HS-SPME.....	68
Tabela 11: Análise de variância (ANOVA) pelo método dos mínimos quadrados considerando os parâmetros tempo e temperatura de extração dos compostos voláteis de cerveja por HS-SPME.....	69
Tabela 12: Duplicata experimental na região próxima do ponto ótimo.....	70
Tabela 13: Cervejas artesanais produzidas e número de voláteis identificados.....	71
Tabela 14: Identificação e áreas brutas ($\times 10^6$) dos cromatogramas obtidos por HS-SPME e GC-MS para voláteis presentes nas cervejas produzidas.....	72

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Composição química do lúpulo	14
1.1.1 Fracionamento das resinas do lúpulo	14
1.1.2 Química das resinas totais do lúpulo.....	15
1.1.3 Resinas macias	17
1.1.4 Biossíntese de humulonas e lupulonas	23
1.1.5 Resinas macias não caracterizadas	24
1.1.6 Resinas duras.....	25
1.1.7 Resinas duras α e β	25
1.1.8 Resina dura- δ	27
1.1.9 Resina dura- ϵ	28
1.1.10 Química dos compostos fenólicos do lúpulo.....	29
1.1.11 Flavonoides	30
1.1.12 Flavan-3-óis e taninos	33
1.1.13 Ácidos fenólicos.....	33
1.1.14 Multifidois glicosilados.....	34
1.1.15 Estilbenos	35
1.1.16 Química dos óleos essenciais do lúpulo	36
1.1.17 Hidrocarbonetos	38
1.1.18 Compostos oxigenados.....	39
1.1.19 Compostos contendo enxofre	42
1.2 Análises para o controle de qualidade do lúpulo	42
1.2.1 Métodos oficiais de análise	42
1.2.2 Análises recomendadas para avaliação da qualidade do lúpulo.....	43
1.3 O lúpulo no processo cervejeiro	44
1.3.1 Visão geral da contribuição do lúpulo no processo cervejeiro.....	44
1.3.2 A importância do lúpulo para estabilidade da espuma da cerveja	47
2 OBJETIVOS.....	50
2.1 Gerais	50
2.2 Específicos	50
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	50

3.1 Amostras de lúpulo	50
3.2 Amostras de cerveja.....	51
3.3 Fabricação das cervejas artesanais	51
3.4 Reagentes	52
3.5 Análises estatísticas	53
3.6 Preparo de amostras e análises cromatográficas	53
3.6.1 Humulonas e Lupulonas.....	53
3.6.2 Óleos essenciais.....	54
3.6.3 Extração de voláteis da cerveja	55
3.6.4 Preparo das amostras de cerveja artesanal	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1 Umidades, α -ácidos e β -ácidos nos lúpulos cultivados no Brasil.....	56
4.2 Rendimento de óleo essencial nos lúpulos cultivados no Brasil.....	58
4.3 Seleção do lúpulo nacional para fabricação da cerveja artesanal	59
4.4 Caracterização e quantificação dos componentes dos óleos essenciais dos lúpulos utilizados para a fabricação da cerveja	60
4.5 Escolha da fibra para a extração de voláteis na cerveja por SPME.....	65
4.6 Otimização das condições de extração dos voláteis da cerveja artesanal por HS-SPME	66
4.7 Análises de voláteis das cervejas artesanais produzidas.....	71
5. CONCLUSÕES	81
6. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS	82
7. REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

Humulus lupulus Linnaeus é o nome científico da espécie pertencente à ordem das Rosales e à família Cannabaceae (Almaguer et al., 2014). O gênero *Humulus* é composto por três espécies, *H. lupulus*, *H. japonicus* e *H. yunnanensis*. Destas, apenas o *H. lupulus* e o *H. japonicus* são cultivadas em larga escala com finalidade comercial (Almaguer et al., 2014; Neve, 1991). O *H. lupulus* é utilizado para a fabricação de cervejas e é descrito como uma trepadeira perene, que produz flores (também chamadas de cones) ricas em resinas (que conferem amargor), polifenóis (com propriedades antioxidantes) e óleos essenciais (que conferem aroma) (Rettberg; Biendl; Garbe, 2018; Bamforth, 2003; Baxter; Hughes, 2001).

É importante destacar que são de interesse para a indústria cervejeira apenas as flores não fertilizadas das plantas fêmeas do lúpulo, pois somente nelas são encontradas, em quantidades apreciáveis, as chamadas glândulas de lupulina, que são responsáveis pela secreção de um pó amarelo (lupulina) que contém as substâncias químicas de interesse para a indústria cervejeira, isto é, as resinas, os polifenóis e os óleos essenciais (Wannenmache et al., 2018; Ting; Ryder, 2017). A Figura 1 ilustra um cone de lúpulo seccionado no qual podem ser observadas as suas principais estruturas morfológicas.

Figura 1: Flor de lúpulo seccionada com destaque para suas principais estruturas morfológicas.

Fonte: Lúpulo Orgânico Tamayo Hops, Brasília – DF. Foto reproduzida com permissão.

Embora existam trabalhos descrevendo o uso do lúpulo na área da saúde (devido as suas propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias, fitoestrogênicas, calmantes etc.), seu uso mais comum é na indústria cervejeira (Zawadzki et al., 2018; Koetter; Biendl, 2010;

Biendl, 2009; Dimpfel; Suter, 2008). O consumo de lúpulo pela indústria cervejeira corresponde a aproximadamente 97% de sua produção. O lúpulo como ingrediente na produção de cerveja confere aroma, amargor e estabilidade coloidal à espuma, além de atuar como antioxidante e antimicrobiano protegendo a cerveja de processos oxidativos e de contaminações microbiológicas (Schonberger; Kosteletzky, 2011). Devido a sua grande importância para a indústria cervejeira, o lúpulo muitas vezes é chamado de “alma da cerveja”, pois, variando-se apenas o tipo e/ou a quantidade de lúpulo em uma mesma receita-base é possível fabricar cervejas totalmente distintas em termos de amargor e aroma (Inui et al., 2013; Nachel; Ettlinger, 2012).

A maior parte da produção mundial de lúpulo (75-80%) é atribuída à países como Alemanha (Hallertauer) e Estados Unidos (Washington, Oregon e Idaho), uma vez que nestes locais podem ser encontradas as condições ótimas para o cultivo do lúpulo, isto é, solos argilosos ou arenosos profundos e de fácil drenagem (as raízes da planta podem atingir mais de 2 m de profundidade), alta exposição à luz durante o crescimento da planta (necessidade de 15 a 18 h de sol por dia) e clima frio (Neve, 1991). Em função destas exigências de clima e solo para cultivo, acreditava-se que não era possível cultivar lúpulo no Brasil. Entretanto, existem algumas iniciativas para a produção de lúpulo em diferentes cidades das regiões sul, sudeste, norte e nordeste do Brasil. No estado de São Paulo, em 2014, foi noticiada a primeira produção de lúpulo em solo brasileiro na região de Campos do Jordão, e mais recentemente, foi noticiado o cultivo de lúpulo em diversas cidades do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e até em Brasília – DF (Chagas; Garcia, 2018). Estas iniciativas de produção de lúpulo no Brasil têm gerado uma grande expectativa para que o país caminhe para a autossuficiência da produção desta importante matéria-prima para a indústria cervejeira. Para se ter uma idéia da demanda de lúpulo no país, é preciso considerar que o setor cervejeiro produz aproximadamente 14 bilhões de litros de cerveja ao ano e, em função disso, o país ocupa o lugar de terceiro maior importador de lúpulo do planeta. Somente em 2015, o Brasil importou cerca de 4 mil toneladas de lúpulo a um custo de mais de R\$ 200 milhões de reais (Araújo, 2016).

Considerando o exposto, nas próximas seções deste capítulo de introdução é apresentada uma revisão crítica e abrangente sobre o estado da arte em fitoquímica do lúpulo e sua relação com a qualidade da cerveja.

1.1 Composição química do lúpulo

A composição química das flores do lúpulo é complexa e uma das maneiras de investigá-la é agrupar os metabólitos secundários produzidos pela planta em diferentes frações como, por exemplo, resinas totais, polifenóis, óleos essenciais, proteínas, ceras, esteroides, entre outros (Ting; Ryder, 2017; Almaguer et al., 2014; Baxter; Hughes, 2001). Na Tabela 1, podem ser observadas as principais classes de constituintes majoritários em flores de lúpulo e suas respectivas quantidades médias expressas em base seca.

Tabela 1: Principais constituintes encontrados em flores secas de lúpulo.

Constituinte	Quantidade % (m/m)
Resinas totais	15 – 30
Óleos essenciais	0,5 – 3
Proteínas	15
Monossacarídeos	2
Polifenóis	4
Pectinas	2
Aminoácidos	0,1
Ceras e esteroides	Traços-25
Cinzas/sais	8
Água	10
Celulose/lignina	43

Adaptado de: Almaguer et al., 2014; Benitez et al., 1997.

É importante destacar que fatores como a variedade do lúpulo, o local e as técnicas de cultivo, o grau de maturação no momento da colheita, além de fatores pós-colheita como secagem, peletização e armazenamento podem levar a variações na proporção dos constituintes apresentados na Tabela 1 (Verzele; Keukeleire, 1991).

1.1.1 Fracionamento das resinas do lúpulo

Foi Hayduck, em 1888, que pela primeira vez obteve as resinas do lúpulo e as denominou de frações α , β e γ . A nomenclatura para cada fração considerava a solubilidade da respectiva fração em diferentes solventes, além da sua capacidade de formar um precipitado na presença de acetato de chumbo. Ao longo dos anos, a nomenclatura das frações das resinas do lúpulo mudou bastante e, em 1897, o termo resina- γ tornou-se obsoleto. Desde então, essa fração tem sido chamada apenas de resina dura. Em 1957, foi estabelecida uma proposta conjunta de nomenclatura para as frações das resinas do lúpulo entre a European Brewery Convention (EBC) e a American Society of Brewing Chemists (ASBC). Esta proposta conjunta passou por uma revisão no ano de 1969 e desde então a nomenclatura estabelecida

permanece a mesma (Almaguer et al., 2014; Hops Liasion Committe, 1969; ASBC; EBC, 1957).

1.1.2 Química das resinas totais do lúpulo

Indiscutivelmente, o método mais usado para a extração e o fracionamento das resinas do lúpulo é uma versão modificada do protocolo de Wöllmer (Agner, 2006). Na Figura 2, pode ser observada a nomenclatura e os principais constituintes das frações do lúpulo. A resina total do lúpulo pode ser obtida por extração com éter dietílico e metanol a frio, podendo ser ainda fracionada em resinas macias e resinas duras. As resinas macias são aquelas que apresentam solubilidade em hexano e constituem de 10-25% das resinas totais, enquanto que as resinas duras são aquelas que não se solubilizam em hexano e constituem de 3-5% do peso total do lúpulo (Houghs, et al., 1982). As propriedades químicas e físicas das resinas macias e duras diferem bastante umas das outras. Por exemplo, a resina macia geralmente exibe uma tonalidade amarelada e tem aspecto de um fluido denso e viscoso, enquanto que as resinas duras se apresentam como um material sólido de cor verde escura (Almaguer et al., 2014).

Figura 2: Nomenclatura e principais constituintes das frações do lúpulo segundo fracionamento obtido pelo protocolo de Wöllmer modificado.

Adaptado de: Almaguer et al., 2014.

1.1.3 Resinas macias

As resinas macias podem ser divididas em α -ácidos e fração β . É nas resinas macias que se encontram os ácidos amargos do lúpulo, constituídos de uma mistura de α - e β -ácidos (humulonas e lupulonas, respectivamente), que podem corresponder a 5-21% da massa do lúpulo em base seca. Os α -ácidos constituem de 5-13% do total das resinas macias. O teor de α -ácidos no lúpulo é muito dependente do cultivar e, em média, representa de 9-10% da massa do lúpulo em base seca, embora já existam no mercado lúpulos com mais de 20% de α -ácidos (Yakima Chief, 2018). Destaca-se a variedade alemã denominada de lúpulo Polaris, que pode apresentar teores de α -ácidos de 18-23% (Healey, 2016). Em nível laboratorial, os α -ácidos podem ser obtidos facilmente em função de sua capacidade de formar um sal de chumbo insolúvel quando em presença de acetato de chumbo em metanol. A fração dos α -ácidos é composta por uma mistura de humulonas análogas, sendo os seus principais constituintes a humulona (35-70% do total de α -ácidos), a cohumulona (20-55%), a adhumulona (10-15%), a prehumulona (1-10%) e a poshumulona (1-3%) (Karabín et al., 2016; Verzele, 1986). A estrutura química dos principais α -ácidos do lúpulo é apresentada na Figura 3.

Figura 3: Estruturas químicas dos principais α -ácidos (humulonas) do lúpulo.

Adaptado de: Verzele; Keukeleire, 1991.

A estrutura molecular beta-tricarbonil conjugada das humulonas são responsáveis pelas suas principais propriedades físico-químicas, como por exemplo, o

cromóforo da molécula (com seus máximos de absorção no UV em 320, 277 e 234 nm), suas características de ácido fraco (devido ao efeito estabilizador do sistema conjugado no enolato, com valores de pKa de 4,0-5,5) e sua propriedade de quelar metais como Fe^{2+} e Cu^{2+} o que ajuda a diminuir a formação de espécies reativas de oxigênio na cerveja (Steenackers; Cooman; Dirk, 2015; Simpson, 1993). A importância primária das humulonas no processo de fabricação de cerveja está relacionada à sua contribuição para o gosto amargo da bebida. Em função disso, vale a pena lembrar que lúpulos com teores de humulonas maiores ou iguais a 10% são denominados de lúpulos de amargor, e usualmente são adicionados no início do processo de fervura do mosto (Palmer, 2017). A adição do lúpulo de amargor no início da fervura deve-se ao fato de que são eles os precursores dos compostos de amargor (iso- α -ácidos ou iso-humulonas), via processo de isomerização durante a fervura do mosto (Verzele, 1986). A isomerização das humulonas em iso-humulonas é importante pois estas últimas são mais solúveis em água e mais amargas que as humulonas. A isomerização é uma reação favorecida em temperaturas elevadas ($\geq 100^\circ\text{C}$) por uma hora. Durante esse processo, cada humulona gera seus dois diastereoisômeros na forma *cis*-iso-humulona e *trans*-iso-humulona (Malowicki; Shellhammer, 2005). O processo de isomerização das humulonas é apresentado na Figura 4. É importante destacar que a denominação *cis/trans* dos iso- α -ácidos é sempre relativa ao grupamento OH do carbono 4 e o grupamento isoprenil do carbono 5 do anel de cinco membros.

Na cerveja, as *cis*-iso-humulonas são consideradas como as principais moléculas responsáveis pelo gosto amargo da bebida, sendo mais amargas que as *trans*-iso-humulonas (Hughes; Simpson, 1996). Além da contribuição para o amargor, as *cis*-iso-humulonas contribuem para estabilidade coloidal da espuma da cerveja como será abordado mais adiante nesta dissertação (Kunimune; Shellhammer, 2008).

A humulona também apresenta atividade antioxidante de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) e de inibição da peroxidação lipídica (valores de IC_{50} de $3,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ frente ao DPPH e IC_{50} de $7,9 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ para inibição da peroxidação lipídica), que em conjunto com os compostos fenólicos contribui para a estabilidade química e sensorial das cervejas (Karabín et al., 2016; Tagashira; Watanabe; Uemitso, 1995).

Figura 4: Reações de isomerização da humulona em iso-humulonas (mais amargas e mais hidrossolúveis) durante o processo de fervura do mosto.

Adaptado de: Jaskula et al., 2008.

Durante o armazenamento do lúpulo as humulonas são propensas a sofrer degradações, e uma das principais características de sua oxidação é a contração do anel através de processos auto-oxidativos que produzem um diol vicinal (Ashurts; Elvidge, 1966). A exposição das humulonas a peróxidos e/ou a luz produz a humulinona (Figura 5), via mecanismo radicalar (Meheus et al., 1964).

Figura 5: Reações de oxidação e conversão fotoquímicas da humulona.

Adaptado de: Steenackers; Cooman; Dirk, 2015.

É importante também destacar outro fenômeno que ocorre devido à exposição da cerveja à luz. Este fenômeno pode gerar compostos de sabor desagradável, motivo pelo qual a maioria das cervejas é comercializada em garrafas de vidro âmbar. O fenômeno de formação de sabor prejudicial ao produto recebe a denominação de *light-struck*, e está relacionado com a fotodegradação das iso-humulonas com consequente formação do 3-metil-2-buten-1-ol (MBT), cujo limiar de percepção é extremamente baixo (em torno de 10 ng L^{-1}). O MBT quando presente na cerveja provoca um odor desagradável, que provoca a rejeição da cerveja pelo consumidor. A Figura 6 apresenta as reações de formação do MBT a partir das iso-humulonas por fotodegradação (Baxter; Hughes, 2001). Nessa reação, representada pela iso-humulona, temos a ativação da molécula via radiação UV, tipicamente nos comprimentos de onda de 350-500 nm, geralmente em presença de riboflavina como fotossensibilizador. Em seguida, ocorre a α -clivagem resultando em um par de radicais. A perda do monóxido de carbono pelo radical acilo e sua recombinação com um radical tiol origina o MBT (Keukeleire, 1999).

Figura 6: Formação do 3-metil-2-buten-1-íol (MBT) a partir da iso-humulona por fotodegradação.

* RF: Riboflavina; ^3RF : Riboflavina no estado excitado (triplete); VIS: Radiação ultravioleta-visível.

Adaptado de: Keukeleire, 1999.

Em relação à fração β (5-15%), esta pode ser dividida em β -ácidos e resinas macias não caracterizadas. Os β -ácidos, que são menos ácidos quando comparados aos α -ácidos, podem ser isolados das resinas macias através da precipitação e remoção dos α -ácidos com acetato de chumbo, como explicado anteriormente. Os β -ácidos correspondem a 3-8 % da massa total das resinas macias (Verzele; Keukeleire, 1991). Algumas variedades comerciais de lúpulo podem conter até mais de 10% de β -ácidos em base seca (Yakima Chief, 2018). Destaca-se a variedade de lúpulo denominado de Teamaker que foi desenvolvida pela empresa ARS Forage, Seed and Cereal Research, em Corvallis, Oregon, Estados Unidos, no final dos anos 2000. Esta variedade apresenta os teores de α -ácidos (0,6-1,8%) e β -ácidos (5,4-13,2%) invertidos, sendo uma

excelente fonte de β -ácidos do lúpulo (Healey, 2016). A composição da fração dos β -ácidos corresponde a uma mistura de análogos de lupulona (30-55% do total de β -ácidos), colupulona (20-55%), adlupulona (5-10%), prelupulona (1-3%) e poslupulona (de quantidade ainda não estabelecida na literatura) (Briggs et al., 2004; Verzele, 1986). A estrutura química dos principais β -ácidos do lúpulo é apresentada na Figura 7.

Figura 7: Estruturas químicas dos principais β -ácidos (lupulonas) do lúpulo.

Adaptado de: Verzele; Keukeleire, 1991.

As lupulonas são estruturalmente muito semelhantes às humulonas; sendo na verdade seus análogos triprenilados. Além disso, as lupulonas são menos ácidas que as humulonas, como pode ser verificado pelos seus valores de pK_a que variam de 4,0-7,8. A existência de uma cadeia lateral isoprenila extra torna as lupulonas significativamente mais hidrofóbicas que as humulonas, tornando-as praticamente insolúveis em meio aquoso e pouco presentes na cerveja. Em função disso, até pouco tempo atrás, considerava-se que os β -ácidos não contribuía para o amargor da cerveja. No entanto, atualmente sabe-se que os β -ácidos geram uma série de produtos de transformação amargos durante a fervura do mosto, demonstrando assim que, além das humulonas, as lupulonas são também potenciais precursores de compostos de gosto amargo para cerveja (Haseleu; Intelmann; Hofmann, 2009). Este processo de transformação das lupulonas será abordado mais adiante nesta revisão (vide Resina dura- δ). As lupulonas são conhecidas principalmente por suas ações antimicrobianas, contribuindo para

estabilidade microbiológica da cerveja. Sua ação ocorre quando são incorporadas nas membranas celulares dos microorganismos onde atuam como carreadores ionóforos móveis, que modificam o fluxo de íons na membrana, levando ao acúmulo intracelular de prótons, à dissipação do gradiente de prótons transmembrana, à diminuição na absorção de nutrientes e à morte celular (Sakamoto; Konings, 2003). Além da sua ação antimicrobiana, a lupulona também apresenta atividade antioxidante de sequestro do radical livre DPPH e de inibição da peroxidação lipídica (valores de IC_{50} de $2,5 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ frente ao DPPH; e IC_{50} de $3,9 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para inibição da peroxidação lipídica), o que contribui também para estabilidade química e sensorial das cervejas (Tagashira; Watanabe; Uemitso, 1995).

1.1.4 Biossíntese de humulonas e lupulonas

A via biossintética de formação dos α - e β -ácidos ocorre nas glândulas de lupulina e pode ser visualizada na Figura 8. É importante destacar que o núcleo aromático das humulonas e lupulonas é um derivado de floroglucinol (que consiste em um anel aromático hidroxilado nas posições C1, C3 e C5) representado pela floroisovalerofenona que tem sua origem na condensação de um isovaleril-CoA e três moléculas de malonil-CoA pela ação da enzima valerofenona sintase (VPS). Após a formação da floroisovalerofenona, esta pode sofrer duas ou três prenilações com pirofosfato de dimetilalilo por ação da enzima *Humulus lupulus* prenyltansferase-1 (HIPT1), que vai dar origem a mono-prenil floroisovalerofenona e a di-prenil floroisovalerofenona (deoxihumulona). A humulona é então formada através da oxidação da deoxihumulona, enquanto que a lupulona é formada por reações adicionais de prenilação da deoxihumulona (Tsurumaru et al., 2012).

Figura 8: Via biossintética de formação de humulonas e lupulonas em lúpulo.

* VPS: valerofenona sintase; HIPT1: *Humulus lupulus* prenyltanserase-1; PT: preniltransferase; MO: monoxigenase. Adaptado de: Tsurumaru et al., 2012.

1.1.5 Resinas macias não caracterizadas

As resinas macias não caracterizadas (2-7%) são assim denominadas por serem consideradas uma fração não específica, isto é, nelas podem ser encontrados resíduos de resinas macias que permanecem mesmo depois da precipitação e/ou cristalização dos α - e β -ácidos, além de conter traços de componentes de óleo essencial e de ceras devido à solubilidade de alguns componentes destas frações em éter de petróleo. Os termos

resinas macias α e β são utilizados para designar as resinas não caracterizadas que surgiram a partir dos α -ácidos ou dos β -ácidos, respectivamente (Almaguer et al., 2014).

1.1.6 Resinas duras

As resinas duras (3-5%) podem ser obtidas como a fração insolúvel em hexano das resinas totais. Por definição, a resina dura é a porção da resina total que é solúvel em metanol e éter dietílico, mas insolúvel tanto em hexano quanto em hidrocarbonetos parafínicos de baixo ponto de ebulição (Briggs et al., 2004). É geralmente aceito que as resinas duras surgem por oxidação das resinas macias, isto é, à medida que o lúpulo envelhece durante o armazenamento, a porcentagem de resina macia cai, enquanto a da resina dura aumenta (Burton; Stevens, 1965). No entanto, existem pesquisas que mostram que existem resinas duras no lúpulo mesmo no estágio inicial de desenvolvimento (Schild; Raum, 1956). Portanto, é necessário diferenciar entre a resina dura nativa do lúpulo e aquela que surge pela auto-oxidação da resina macia durante a secagem e o armazenamento (Stevens, 1967). Sendo assim, as resinas duras ainda carecem de muito estudo químico de caracterização, sendo um atrativo campo de estudo.

1.1.7 Resinas duras α e β

No início da década de 1960, Burton e Stevens propuseram a existência de duas frações nas resinas duras e as denominaram de resina dura- α e resina dura- β . A resina dura- α constitui a menor porção das resinas duras e pode ser obtida pela sua capacidade de formar um sal de chumbo insolúvel quando tratada com uma solução de acetato de chumbo. Separações por cromatografia de troca iônica da resina dura- α revelaram a presença de pequenas quantidades de α -ácidos que não solubilizaram completamente no fracionamento com hexano no momento da obtenção das resinas macias. Entretanto, nem toda a composição da resina dura- α é composta apenas de alfa-ácidos (Burton; Stevens, 1965). Vale a pena destacar que a maior parte da composição química das resinas duras ainda permanece desconhecida e aguardando sua caracterização química.

A resina dura- β constitui a maior parte da resina dura total. Diferentemente da resina dura- α , essa fração não forma sais insolúveis na presença de acetato de chumbo (Stevens, 1967; Burton; Stevens, 1965). O prenilflavonoide xanthohumol (0,3-1,5%) é o componente majoritário da resina dura- β (Almaguer et al., 2014). Além do xanthohumol

podem ainda ser encontradas na composição da resina dura- β outras 13 chalconas relacionadas (Figura 9): desmetilxanthohumol, xantogalenol, 4'-*O*-metilxanthohumol, 3'-geranilchalconaringenina, 3',5'-diprenilchalconaringenina, 5'-prenilxanthohumol, flavokawina, xanthohumol B, xanthohumol C, xanthohumol D, xanthohumol E, α , β -dihidroxanthohumol e iso-dehidrocicloxanthohumol hidratado (Stevens; Jonathan, 2004).

Figura 9: Principais prenilflavonoides presentes na resina dura- β do lúpulo.

Adaptado de: Stevens; Jonathan, 2004

É importante destacar que o xanthohumol tem sido considerado um promissor agente anticancerígeno enquanto seus derivados 8-prenilnaringenina e isoxanthohumol apresentam potentes ações fitoestrogênicas, de modo que eles foram indicados por alguns pesquisadores em dietas quimiopreventivas (Steenackers; Cooman; Dirk, 2015; Stevens; Jonathan, 2004). O xanthohumol é encontrado única e exclusivamente no lúpulo, de modo que sua presença na dieta se dá apenas pelo consumo de cerveja, cuja ingestão média é estimada em aproximadamente $0,06 \text{ mg } 100 \text{ mL}^{-1}$ de cerveja (para cervejas tipo American *Lager* ou *Pilsen*) (Stevens; Jonathan, 2004). Infelizmente, a

maior parte do xanthohumol do lúpulo é perdida no processo de produção de cerveja através da reação de isomerização térmica das chalconas em flavonas, na qual o xanthohumol é ciclizado em isoxanthohumol conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10: Mecanismo de conversão térmica do xanthohumol em isoxanthohumol.

Adaptado de: Steenackers; Cooman; Dirk, 2015.

1.1.8 Resina dura- δ

Em 1952, Walker et al. encontraram uma porção (0,6-4%) da resina dura que é solúvel em água, e que apresenta a característica de ser intensamente amarga, mas de um amargor agradável. Eles denominaram esta fração da resina dura como resina dura- δ . Estudos posteriores (Abson et al., 1954) revelaram que a resina dura- δ acumula-se durante o armazenamento do lúpulo (possivelmente por processos oxidativos das humulonas e lupulonas), e que sua quantidade vai depender principalmente da variedade do lúpulo. Separações preliminares da resina dura- δ por cromatografia em coluna revelaram a existência de seis subfrações (δ I- δ VI), sendo que nenhuma é totalmente pura. Em um outro estudo, foram obtidas 11 subfrações da resina dura- δ , que puderam ser diferenciadas com base na sua potência de amargor e nas suas propriedades antimicrobianas (Almaguer et al., 2012). Destaca-se na composição da resina dura- δ a presença de moléculas com anéis de cinco membros, denominadas de huluponas e ácido hulupínico (Figura 11).

As huluponas (0,5-3% da massa do lúpulo seco) são de gosto amargo excepcionalmente agradável, e podem ser definidas como o produto intermediário da oxidação dos β -ácidos durante a fervura do mosto. Elas são constituídas de análogos dos β -ácidos (cohulupona, hulupona e adhulupona). Em uma investigação sobre a formação de huluponas durante a fervura do mosto, verificou-se que uma parte considerável destas é transferida para o mosto na forma de sais (Stevens; Wright, 1961; Spetsig; Steninger, 1960), enquanto que a maior parte delas é retida no *trub* (aglutinado de

proteínas e outras impurezas indesejadas que precipitam pela fervura do mosto) após a ebulição do mosto. Em contraste com as resinas duras, não foram detectadas huluponas em lúpulo fresco (Spetsig; Steninger, 1960). Embora as huluponas sejam produtos intermediários da oxidação dos β -ácidos, quando presentes no lúpulo, elas são insolúveis em solventes orgânicos e solúveis em água, portanto, componentes da resina dura δ (Stevens; Wright, 1961).

Figura 11: Estruturas químicas de huluponas e do ácido hulupínico.

Adaptado de: Almaguer et al., 2014.

O ácido hulupínico por sua vez é considerado o produto final hidrossolúvel da degradação dos β -ácidos em processos oxidativos. Ele apresenta a característica de não ser amargo. A solubilidade do ácido hulupínico foi testada em água e foi estabelecida como sendo aproximadamente 1 g L^{-1} em pH 4,0 (Burton; Stevens, 1965).

1.1.9 Resina dura- ϵ

A resina dura- ϵ representa até 80% da composição das resinas duras totais. Ela possui uma fração não solúvel em água que apresenta gosto amargo, e, assim como a resina- δ , a resina- ϵ não é homogênea. Estudos de fracionamento revelaram a existência de mais de uma centena de subfrações na resina- ϵ (Almaguer et al., 2014). Estas frações foram estudadas quanto às suas propriedades de amargor e atividade antimicrobiana.

Verificou-se que as subfrações mais polares não apresentaram atividade antimicrobiana, mas que as frações mais apolares eram mais amargas e de maior atividade antimicrobiana (Almaguer et al., 2014). Em outro estudo, a resina-ε foi investigada por análise sensorial, UV-vis, HPLC-TOFMS e RMN 1D/2D. Foram encontrados na resina-ε resíduos de polifenóis e um total de 11 compostos de gosto amargo inéditos que foram relatados pela primeira vez na literatura: 1'',2''-dihidroanthohumol-F, 4'-hidroxitunicatachalcona, isoxantholupona, 1-metoxi-4-prenilfloroglucinol, dihidrociclohumulonahidroquinona, xanthohumol-M, xanthohumol-N e xanthohumol-P. Neste mesmo trabalho, os autores também quantificaram estes compostos em cervejas tipo *pilsen* revelando a contribuição ativa dos compostos da resina-ε para o amargor da cerveja. De modo que, segundo os autores do trabalho, seria possível fabricar cervejas enriquecidas com flavonoides prenilados utilizando-se a adição de resina-ε na fabricação da cerveja (Dresel; Dunkel; Hofmann, 2015).

1.1.10 Química dos compostos fenólicos do lúpulo

Os compostos fenólicos do lúpulo constituem em média 4% da massa seca das flores de lúpulo e apresentam uma vasta classe de compostos com distintas características químicas, como por exemplo, flavonoides, flavan-3-óis, taninos, ácidos fenólicos, flavonoides prenilados, multifídois glicosilados e estilbenos (Goiris et al., 2014; Verzele; Keukeleire, 1991). Os compostos fenólicos do lúpulo encontram-se principalmente nas pétalas e no eixo central do cone de lúpulo (ou "*strig*"), com exceção dos prenilflavonoides (xanthohumol, isoxanthohumol e compostos relacionados) que são encontrados majoritariamente nas glândulas de lupulina (Roberts; Wilson, 2006). Os compostos fenólicos do lúpulo são antioxidantes naturais e, juntamente com os do malte, são responsáveis pela atividade antioxidante do mosto e da cerveja, protegendo-os de processos oxidativos, melhorando também a sua estabilidade e sabor (Wannenmacher et al. 2018; Goiris et al., 2014).

De modo geral, os compostos fenólicos do lúpulo de baixa massa molar atuam principalmente como antioxidantes, sequestradores de radicais livres, inibidores de lipoxigenases e quelando metais de transição envolvidos em processos oxidativos. Por outro lado, os compostos fenólicos de alta massa molar podem formar complexos com as proteínas da cerveja, promovendo a instabilidade coloidal da bebida com a consequente formação de turbidez e nebulosidade (Goiris et al., 2014). Isso hipoteticamente explicaria a característica de turbidez em cervejas elaboradas com

grandes quantidades de lúpulo como é o caso das cervejas tipo New England IPA. No que diz respeito ao sabor, Goiris et al., (2014), procurando compreender a influência dos polifenóis nas propriedades organolépticas da cerveja, fracionaram um extrato fenólico de lúpulo nas seguintes classes: proantocianidinas, flavonóis glicosilados e flavonoides prenilados, e adicionaram estas frações à cerveja que foi posteriormente avaliada por análise sensorial. Estes autores concluíram que, com exceção das proantocianidinas (que conferem adstringência), todas as demais frações fenólicas investigadas foram altamente ativadoras do sabor da cerveja, com efeitos positivos no paladar, e capazes de melhorar a ‘sensação de boca’ da cerveja. Em outro trabalho, McLaughlin, Lederer e Shellhammer (2008) adicionaram extrato fenólico de lúpulo a uma cerveja tipo *Lager* comercial de baixo teor de amargor para comparar o amargor provocado pelos compostos fenólicos do lúpulo com o amargor provocado pela adição de iso- α -ácidos pré-isomerizados. Estes autores verificaram que à medida que os níveis de fenólicos aumentavam, o amargor produzido era avaliado sensorialmente como mais “duro” e a cerveja também se mostrava mais adstringente. Os autores verificaram que cervejas com 200 mg L⁻¹ de compostos fenólicos eram mais amargas do que as cervejas com 10 mg L⁻¹ de iso- α -ácidos, no entanto, os altos níveis de compostos fenólicos testados tornavam a cerveja de um amargor descrito como “duro, medicinal e metálico”.

1.1.11 Flavonoides

Quimicamente, os flavonoides são a classe mais diversificada e difundida de compostos fenólicos da natureza, com diferentes funções metabólicas nas plantas (absorção de radiação UV, polinização, defesa contra bactérias e fungos etc.). Estruturalmente, eles têm um esqueleto comum que consiste em três unidades carbônicas organizadas na forma C6-C3-C6. Os flavonoides são sintetizados pela combinação da via dos fenilpropanoides e da via dos policetídeos (Figura 12). Como exemplos mais comuns, podem-se citar a quercetina encontrada no lúpulo em concentrações de 0,05-0,23%, e o kaempferol, encontrado no lúpulo em concentrações de 0,02-0,24% (Almager et al., 2014).

Figura 12: Resumo da via biossintética de flavonoides do lúpulo.

* PAL: Fenilalanina amônia-liase; TAL: tirosina amônia-liase; C4H: cinamato 4-hidroxilase; 4CL: 4-cumarato-CoA ligase; AAC: ácido 1-carboxílico-1-aminociclopropano oxidase; 3OGT: 3-O-glicosil-O-transferase; CS: chalcona sintase; HIPT1: *Humulus lupulus* prenilttransferase-1; OMT: O-metiltransferase; CHI: chalcona isomerase; F3H: flavanona 3-hidroxilase; DFR: dihidroflavonol 4-redutase; FLS: flavonol sintase; FMO: flavonoide 3-monooxygenase; CPR: citocromo P450 redutase; F3'5'H: flavonoide 3'5'-hidroxilase; LAR: leucoantocianidina redutase; ANS: antocianidina sintase; ANR: antocianidina redutase. Adaptado de: Bocquet et al., 2018.

O ponto de partida para a síntese dos flavonoides é a conversão da fenilalanina em *p*-cumaroil-CoA pela via do ácido cinâmico. A chalcona sintase (CS) é a primeira enzima envolvida na biossíntese de flavonoides. Esta enzima inicia a formação do esqueleto da chalcona (tetrahidrochalcona), catalisando a adição de três moléculas de

malonil-CoA, obtidas através da via dos poliketóides, a uma molécula de *p*-cumaroil-CoA. É a partir deste esqueleto básico que todos os outros grupos de flavonoides são construídos (Bocquet et al., 2018; Falcone-Ferreira; Rius; Casati, 2012).

A tetrahydrochalcona (por exemplo, a chalconaringenina) sofre ação de uma chalcona isomerase (CHI) que dá origem a uma flavanona (por exemplo, a naringenina). Então, a enzima flavanona 3-hidroxilase (F3H) promove uma hidroxilação no carbono C3 da flavanona originando um dihidroflavonol (por exemplo, dihidrokaempferol). Para finalizar a formação de um flavonol (por exemplo, kaempferol), a enzima flavonol sintase (FLS) introduz uma ligação dupla entre os carbonos C2 e C3. Os flavonoides que normalmente podem ser encontrados no lúpulo são as formas glicosiladas de quercetina, kaempferol, morina e miricetina (Figura 13) (Bocquet et al., 2018). Destes, a quercetina é a que apresenta o maior potencial antioxidante. Outra característica interessante é que formas glicosiladas de kaempferol são mais abundantes em lúpulos de aroma se comparados a lúpulos de amargor (Almaguer et al., 2014).

Figura 13: Estruturas químicas de alguns dos principais flavonoides do lúpulo.

Adaptado de: Bocquet et al., 2018.

1.1.12 Flavan-3-óis e taninos

Flavan-3-óis podem ter origem em duas vias biossintéticas distintas, de acordo com a sua conformação R ou S no substituinte C3 do anel central. Eles estão entre os últimos compostos sintetizados na via dos flavonoides (Figura 12). Eles podem ser sintetizados a partir da redução de um flavan-3,4-diol (por exemplo, leucoantocianidina) pela ação da enzima dihidroflavonol 4-redutase (DFR), ou então após a redução de uma antocianidina pela ação da antocianidina redutase (ANR) (Bocquet et al., 2018). Os monômeros de flavan-3-óis mais comumente encontrados no lúpulo em concentrações de 0,03-0,3% são a catequina e a epicatequina. Estes compostos podem formar oligômeros ou polímeros que são denominados de proantocianidinas (0,20-1,30%) ou taninos condensados (< 2%) (Almager et al., 2014). No lúpulo, os taninos condensados mais comuns são os derivados da catequina e da epicatequina (Figura 14) (Bocquet et al., 2018).

Figura 14: Estruturas químicas de alguns flavan-3-óis e taninos do lúpulo.

Adaptado de: Bocquet et al., 2018.

1.1.13 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos podem ser encontrados em pequenas concentrações (< 0,01-0,03%) (Almager et al., 2014). Eles são compostos orgânicos que apresentam pelo

menos um grupo fenólico e uma carboxila na mesma molécula (Figura 15). Eles podem ser encontrados tanto na forma livre quanto na forma glicosilada. A estrutura básica dos ácidos fenólicos é a mesma, mas a sua diversidade vem da posição e do número de substituintes no anel aromático (Bocquet et al., 2018). Os ácidos hidroxicinâmicos derivam da via dos fenilpropanoides por uma primeira transformação da L-fenilalanina em ácido cinâmico, que é então hidroxilado para formar ácido *p*-cumárico. No lúpulo, os ácidos hidroxicinâmicos mais abundantes são o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido sinápico (Karabín et al., 2016). Ácidos hidroxibenzoicos podem ser biossintetizados no início da via do chiquimato a partir do ácido dehidrochiquímico, ou então a partir da transformação do ácido cinâmico em cinamoil-CoA por uma ligase de CoA, na via dos fenilpropanoides. No lúpulo, os ácidos hidroxibenzoicos são representados, entre outros, pelo ácido gálico, ácido siríngeo e ácido vanílico (Karabín et al., 2016; Magalhães et al., 2010).

Figura 15: Estruturas químicas de alguns ácidos fenólicos do lúpulo.

Adaptado de: Bocquet et al., 2018.

1.1.14 Multifidois glicosilados

Os multifidois glicosilados do lúpulo podem ser encontrados em quantidades que variam de 0,05-0,5% (Almager et al., 2014). Eles são um grupo de compostos fenólicos representados por três derivados floroglucinois glicosilados com diferentes cadeias laterais: co-multifidol *glcp*, ad-multifidol *glcp* e n-multifidol di-C-*glcp* (Figura 16). Estes compostos são conhecidos por serem substâncias polares e solúveis em água, e por apresentarem baixíssimo limiar de percepção de gosto amargo (5, 10 e 37 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente). Semelhantes aos α -ácidos e β -ácidos do lúpulo, os multifidois

glicosilados são derivados do acilfloroglucinol com diferentes cadeias laterais, no entanto os multifidois glicosilados não são encontrados nas resinas do lúpulo, sendo extraídos para o mosto durante a etapa de fervura, de modo que também contribuem para o amargor da cerveja (Dresel; Dunkel; Hofmann, 2015).

Figura 16: Estruturas químicas dos multifidois glicosilados do lúpulo.

Adaptado de: Dresel; Dunkel; Hofmann, 2015.

1.1.15 Estilbenos

A presença de até 2 mg kg^{-1} de estilbenos como o *trans*-resveratrol no lúpulo é muito inferior àquela encontrada no vinho, no entanto, a confirmação da sua presença no lúpulo merece destaque devido aos efeitos cardioprotetivos que o resveratrol é capaz de proporcionar (Jerkovic; Collin, 2007). A presença de *trans* e *cis*-resveratrol, bem como de suas formas glicosiladas *trans*-piceid e *cis*-piceid (Figura 17) foi confirmada em cerveja, com valores máximos de *trans*-resveratrol de $66,74 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Chiva-Blanch, et al., 2011).

Figura 17: Estruturas químicas de alguns dos principais estilbenos do lúpulo.

Adaptado de: Almaguer et al., 2014.

1.1.16 Química dos óleos essenciais do lúpulo

A ISO 9235:2013 define óleo essencial como o produto obtido a partir de uma matéria-prima de origem vegetal, por destilação com água ou vapor d'água, ou ainda por destilação a seco, ou por prensagem mecânica quando se tratar de frutas cítricas (Bicchi; Joulain, 2018). Os óleos essenciais do lúpulo são produzidos nas glândulas de lupulina, e representam de 0,5 a 3% da massa do lúpulo seco (Bocquet et al., 2018; Almaguer et al., 2014; Eyres; Dufour, 2009).

Lúpulos que apresentam baixas quantidades de humulonas e lupulonas ($\leq 5\%$) e que são capazes de conferir aromas característicos e intensos em função da composição química dos seus óleos essenciais são denominados de lúpulos de aroma (Palmer, 2017). Estes, diferentemente dos lúpulos de amargor, são geralmente adicionados no final do processo de fervura do mosto ou na etapa de *wirpool* (lupulagem tardia), ou então durante a maturação da cerveja (*dry hopping*) para evitar as perdas dos voláteis presentes nos óleos essenciais, concentrando assim os compostos de aroma na cerveja. Os óleos essenciais do lúpulo contribuem para o aroma e o sabor da cerveja conferindo uma enorme gama de notas de aroma para os diferentes tipos de cerveja (notas de amadeirado, cítrico, especiarias, floral, frutado, sulfuroso, herbal, resinoso, terroso e picante) (Bamforth, 2010).

Majoritariamente os óleos essenciais do lúpulo são constituídos de terpenoides que são formados principalmente por meio da via biossintética do acetato-mevalonato (Bocquet et al., 2018). Por esta via, o ácido mevalônico sofre biotransformações relativas à eliminação do seu grupamento álcool seguido de descarboxilação, o que produz o isopentenil pirofosfato e o prenil pirofosfato (Dimetil alilpirofosfato). O acoplamento (ligação cabeça-cauda) dessas duas unidades de 5 carbonos dá origem ao geranil pirofosfato, precursor dos monoterpênicos que apresentam 10 carbonos. Em seguida, um novo acoplamento do isopentenil pirofosfato com geranil pirofosfato dá origem ao farnesil pirofosfato que pode gerar os sesquiterpenos que apresentam 15 carbonos (Shell, 2015). Assim, em função do acoplamento cabeça-cauda de blocos construtores de cinco carbonos os terpenoides sempre apresentarão número de carbonos múltiplos de 5. A rota biossintética de produção dos principais terpenoides do lúpulo é apresentada na Figura 18.

Figura 18: Resumo da via biossintética de formação de terpenoides do lúpulo.

* DMAPPI: Dimetil alilpirofosfato isomerase; IPPI: Isopentenil pirofosfato isomerase; GPPS: Geranil pirofosfato sintase; FPPS: Farnesil pirofosfato sintase; MoST: Monoterpeno sintase; SeST: Sequiterpeno sintase. Adaptado de: Bocquet et al., 2018; Shell, 2015.

Sabe-se que o teor e a composição química dos óleos essenciais do lúpulo podem ser afetados por fatores, como: variedade do lúpulo, condições de cultivo, ponto de maturação no momento da colheita, condições de secagem, contato com o oxigênio do ar e condições de armazenamento (Howard; Slater, 1957). Apesar disso, a literatura relata a existência de mais de 200 compostos químicos diferentes conclusivamente identificados nos óleos essenciais do lúpulo por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS) (Almaguer et al., 2014). Para se estudar os compostos químicos presentes nos óleos essenciais do lúpulo, eles são usualmente divididos em: i) hidrocarbonetos (grupo que compreende os hidrocarbonetos alifáticos, monoterpenos e

sesquiterpenos), ii) oxigenados (álcoois, aldeídos, ácidos, cetonas, epóxidos e ésteres), e iii) compostos contendo enxofre (organosulfurados diversos) (Sharpe; Laws, 1981).

1.1.17 Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos alifáticos são constituídos de misturas de isopreno e pequenas quantidades de alcanos de número variável de carbonos (C5-C17). Os monoterpenos por sua vez são constituídos de misturas de hidrocarbonetos acíclicos (por exemplo, o β -mirceno), monocíclicos (limoneno, *p*-cimeno, α -felandreno e β -felandreno) e bicíclicos (α -pineno e β -pineno). Dentre os hidrocarbonetos presentes nos óleos essenciais do lúpulo, o β -mirceno (notas de aroma balsâmico, mofado e especiarias) merece destaque, pois ele costuma ser o composto majoritário encontrado em níveis de 0,3 até 60% do total do óleo essencial (Praet et al., 2015). Os sesquiterpenos por sua vez podem ser acíclicos (α -farneseno e β -farneseno), monocíclicos (germacrenoB, germacrenoD e humuleno), bicíclicos (β -cariofileno, β -selineno e cadineno) e tricíclicos (muuroleno, α -cubebeno, calameleno e β -elemeno). Os sesquiterpenos majoritários são o α -humuleno (notas de amadeirado), β -cariofileno (amadeirado e especiarias) e β -farneseno (amadeirado, cítrico e doce). Estes três sesquiterpenos, além do β -mirceno, chegam a constituir entre 80 e 90% do teor de muitos óleos essenciais de lúpulo. Uma característica dos hidrocarbonetos dos óleos essenciais é sua baixa solubilidade em água, de modo que a maior parte deles é volatilizada durante a fervura do mosto. Na Figura 19 podem ser observadas as estruturas químicas destes hidrocarbonetos.

Stevens, Roberts e Willians (1961), investigando os efeitos do ácido giberélico no rendimento e na composição química do lúpulo, verificaram que os óleos essenciais começam a ser produzidos após o desenvolvimento das resinas e continuam sendo sintetizados até o momento da colheita, comprovando assim o efeito do ponto de maturação na composição química e na qualidade dos óleos essenciais do lúpulo.

Figura 19: Estruturas químicas e quantidades (%) para os principais hidrocarbonetos encontrados nos óleos essenciais do lúpulo.

* tr: Quantidade em nível traço. Adaptado de: Bocquet et al., 2018.

1.1.18 Compostos oxigenados

Embora a fração de compostos oxigenados constitua em média apenas 30% do total dos óleos essenciais do lúpulo, a complexidade desta fração é muitas vezes maior que aquela encontrada nos hidrocarbonetos (Jahnsen, 1962). Os compostos oxigenados dos óleos essenciais do lúpulo constituem uma mistura complexa de álcoois terpênicos (linalol, geraniol e nerol), álcoois sesquiterpênicos (nerolidol, α -bisabolol e humulol) e álcoois alifáticos (1-octen-3-ol, *trans*-hexen-1-ol e álcool benzílico), aldeídos (hexanal, geranial e neral); ácidos (ácido-3-metil-butanoato e ácido-2-metilpropanoico), cetonas (2-heptanona, carvona, humulenona II e 2-metil-2-butanoato), epóxidos (humuleno epóxido I, humuleno epóxido II, humuleno diepóxido III e óxido de cariofileno), ésteres saturados (hexanoato, octanoato e decanoato), ésteres insaturados (4-decenoato, 4,8-decadienoato e 8-dodecanoato), ésteres terpênicos (geranil acetato e geranil isobutirato),

ésteres ramificados (metil propanoatos, metil butanoatos, formatos, acetatos, hexanoatos e heptanoatos).

Um estudo de Sharpe e Laws (1981) revelou a existência de 60 aldeídos e cetonas, 70 ésteres, 50 álcoois, 25 ácidos e 30 compostos heterocíclicos oxigenados nos óleos essenciais de lúpulo. Um detalhe importante é sempre diferenciar os compostos oxigenados nativos do óleo essencial daqueles que podem se originar a partir da oxidação do lúpulo seja ela proposital (em certos processos para aumentar as quantidades de hepóxidos de humuleno) ou por falhas no processamento e/ou armazenamento. Dieckmann e Palamand (1974), investigando os efeitos da auto-oxidação do β -mirceno, relataram que mais de 40 compostos oxigenados podem ser formados a partir deste por reações de ciclização, oxidação, desproporcionamento e polimerização.

Dentre os compostos oxigenados dos óleos essenciais do lúpulo, alguns merecem destaque, como é o caso do linalol ($\leq 1,9\%$), que é um dos álcoois terpênicos mais abundantes do lúpulo. O linalol (de aroma floral-frutado) é um composto quiral, de modo que seus dois estereoisômeros podem ser facilmente encontrados no lúpulo, isto é, o (R) (-) linalol (de aroma mais potente) e (S) (+) linalol (encontrado em menores quantidades). O linalol é um dos poucos componentes do óleo essencial do lúpulo que é considerado como importante para o sabor da cerveja. Isso ocorre porque ele é um composto polar, e em função disso pode se solubilizar na cerveja, contribuindo para o aroma floral e frutado da bebida (o seu limiar de percepção na cerveja varia de 10-80 ppb, dependendo do tipo de cerveja) (Meilgaard, 1975; Jahnsen, 1962). Algumas variedades de lúpulo se destacam por serem consideradas ricas em linalol, tais como: Amarillo (0,5-0,8%), Centennial (0,6-0,9%), Citra (0,6-0,9%), Glacier (0,8-1,1%) e Nugget (0,5-0,8%).

O geraniol é outro composto oxigenado de interesse encontrado nos óleos essenciais do lúpulo. Takoi et al. (2010) realizaram estudos sobre a biotransformação de álcoois monoterpênicos do lúpulo como linalol (floral-frutado), geraniol (rosa e gerânio), β -citronelol (limão e lima), nerol (doce, cítrico e rosas) e α -terpineol (oleoso, anís e menta), e sua contribuição para o sabor da cerveja. Estes autores encontraram que o geraniol apresenta uma diminuição drástica durante a fase inicial da fermentação da cerveja, uma vez que parte dele é convertida por ação das leveduras em β -citronelol.

Estes autores também relataram que existe um sinergismo entre um excesso de linalol e os terpenos geraniol e β -citronelol, o que leva à percepção do aroma cítrico característico em certas variedades de lúpulo como é o caso do lúpulo Citra (0,3-0,5% de geraniol e 0,6-0,9% de linalol). Algumas variedades de lúpulo se destacam por serem consideradas ricas em geraniol: Bravo (0,7-0,9%), Citra (0,3-0,5%), Centennial (1,2-1,8%), Chinook (0,7-1%), e Mosaic (0,5-0,9%).

Também merece destaque, pela complexidade de notas de aroma e impacto no sabor da cerveja, os epóxidos de humuleno I (feno), epóxido de humuleno II (cedro e mofado) e epóxido de humuleno III (cedro), bem como o óxido de cariofileno (doce, frutado, amadeirado e herbal) (Opstaele et al., 2013). Segundo Shellhammer (2018), variedades de lúpulo que apresentam grandes quantidades de humuleno como o Hallertauer Mittelfrüh (51% de humuleno) são submetidas a processos de envelhecimento em fardos por várias semanas antes da peletização, o que resultará em maiores quantidades de epóxidos de humuleno, bem como outros produtos de oxidação do óleo essencial do lúpulo, que alguns cervejeiros acreditam que podem aumentar significativamente o potencial de aroma da cerveja. As estruturas químicas dos principais terpenos oxigenados que podem ser encontrados nos óleos essenciais do lúpulo podem ser visualizadas na Figura 20.

Figura 20: Estruturas químicas e quantidade (%) para alguns compostos oxigenados encontrados nos óleos essenciais do lúpulo.

Adaptado de: Bocquet et al., 2018.

1.1.19 Compostos contendo enxofre

A classe dos compostos contendo enxofre representa a menor porcentagem da constituição dos óleos essenciais do lúpulo. Entretanto, seus constituintes possuem aromas intensos e com baixos valores de limiar de percepção de odor ($\leq 0,1$ ppb). Em geral, estes compostos conferem aromas que lembram sulfurados, vegetais cozidos, mofo, repolho ou cebola, o que acaba prejudicando o sabor da cerveja. Entre esses compostos temos os tiois como a 4-mercaptopentano-2-ona (4MMP) (aroma de groselha preta e urina de gato) que possui um limiar de percepção de odor de 1,5 ppt (Kishimoto, 2006). Dentre os tioésteres podem ser encontrados o *S*-metil-2-metil-tiobutanoato (aroma de legumes cozidos e de queijo) e entre os organossulfurados merece destaque o dimetil sulfeto (DMS) (milho cozido) que pode se gerar devido à degradação térmica do sulfóxido de *S*-metilcisteína do lúpulo (Lermusieau; Collin, 2003; Gijss et al., 2000). Por outro lado, alguns compostos sulfurosos podem ser de aroma agradável como é o caso do tioéster *S*-metil-2-metil tiobutanoato (aroma de trufa), e o *S*-metil tiohexanoato que confere notas de aroma verde e frutal que lembram o abacaxi (Almaguer, et al., 2014).

1.2 Análises para o controle de qualidade do lúpulo

1.2.1 Métodos oficiais de análise

Sempre que houver necessidade da análise laboratorial do lúpulo e seus derivados, um cuidado importante é se certificar de que o laboratório contratado para realizar a análise utiliza protocolos oficiais de análise. Os métodos de análise da American Society of Brewing Chemists (ASBC) e European Brewery Convention (EBC) são considerados oficiais e reconhecidos por ambas as entidades. Estes métodos estão descritos em protocolos que são comercializados por estas entidades, e que podem ser facilmente adquiridos.

As análises físico-químicas do lúpulo são especialmente úteis para o mestre cervejeiro calcular a quantidade de lúpulo que será utilizado em uma receita. O que é fundamental para se alcançar as características desejadas para o estilo da bebida que está sendo produzida, bem como para manter o padrão de qualidade do aroma e sabor entre lotes de produção. Além disso, as análises servem também para se determinar o ponto de colheita de lúpulos e o preço de mercado do lúpulo em função da quantidade de α -ácidos, β -ácidos e do teor de óleos essenciais a cada nova safra (em função da

variação dos fatores edafoclimáticos e das práticas agrícolas), além de se avaliar o rendimento da produção de uma determinada área em quilogramas de α -ácidos produzidos por hectare ou em litros de óleo essencial por hectare.

No que diz respeito à análise físico-química e controle de qualidade de lúpulo, a ASBC possui os seguintes métodos de análise: Hops-1: Amostragem; Hops-2: Exame físico; Hops-3: Afídios em lúpulo; Hops-4: Umidade; Hops-5: Resinas; Hops-6: Alfa e beta ácidos em lúpulo e lúpulo peletizado; Hops-7: Alfa e beta ácidos em lúpulo por cromatografia de troca iônica; Hops-8: Extratos em lúpulo não isomerizado; Hops-9: Extratos em lúpulo isomerizado; Hops-10: Ácidos amargos em lúpulo não isomerizado por cromatografia de troca iônica; Hops-11: Gradiente de eluição dos constituintes do lúpulo por cromatografia de troca iônica utilizando Sephadex; Hops-12: Índice de estocagem; Hops-13: Óleos essenciais totais em lúpulo e lúpulo peletizado por destilação a vapor; Hops-14: Alfa e beta ácidos em lúpulo e em extratos de Lúpulo por HPLC; Hops-15: Iso-alfa-ácidos em lúpulo peletizado isomerizado por HPLC; Hops-16: Iso-alfa, alfa e beta-ácidos em extratos de lúpulo e extratos de lúpulo isomerizados por HPLC; Hops-17: Óleos essenciais de lúpulo por cromatografia gasosa capilar e detector de ionização em chama; Hops-18: Determinação de tetrahidroiso- α -ácidos em produtos de lúpulo por espectrofotometria.

1.2.2 Análises recomendadas para avaliação da qualidade do lúpulo

Apesar desta grande quantidade de métodos de análise, o que se espera de um resultado de análise de lúpulo é o emprego dos métodos oficiais, sem adaptações que possam comprometer a qualidade analítica, para as seguintes determinações mínimas: umidade, porcentagem de alfa e beta ácidos totais, teores de cohumulona, n-+ adhumulona, colupulona e n-+adlupulona, porcentagem de óleos essenciais, teores de mirceno, 2-metil-butil isobutirato, cariofileno, farneseno e humuleno.

Além das análises físico-químicas descritas, existem também diversos testes sensoriais que empregam provadores devidamente treinados, de modo a fornecerem informações sobre avaliação da intensidade de aromas e sabores do lúpulo. Os provadores podem também realizar testes de diferença e similaridade que servem para avaliar se duas amostras são distintas em termos sensoriais, o que é especialmente útil em programas de melhoramento genético. Complementarmente a estes testes, podem também ser realizados os chamados testes sensoriais descritivos quantitativos, como por

exemplo, a análise descritiva quantitativa, que fornece importantes informações sobre as características de cor, aroma e sabor de diferentes variedades de lúpulo (Shellhammer, 2009). Os protocolos para análise sensorial de lúpulo estão também descritos nos métodos da ASBC (Análise sensorial-1 a 17).

1.3 O lúpulo no processo cervejeiro

1.3.1 Visão geral da contribuição do lúpulo no processo cervejeiro

Para o processo de produção de cerveja, os grãos de malte, ricos em amido e enzimas, devem ser moídos e hidratados com água quente, num processo denominado de brassagem. Nesta etapa, tipicamente mistura-se três partes de água em temperatura de aproximadamente 68 °C para cada parte de malte. Nesta temperatura, os grânulos de amido gelatinizam tornando-se mais susceptíveis a digestão enzimática pelas enzimas α - e β -amilases dos grãos de malte. A α -amilase, especificamente, catalisa a hidrólise de ligações glicosídicas α -D-(1 $\rightarrow$ 4), que libera α -dextrinas ramificadas e malto-oligossacarídeos que darão corpo (viscosidade) à cerveja. Por outro lado, a β -amilase, uma exoglicosidase, $\alpha\rightarrow\beta$ inversora, libera unidades de maltose a partir de extremidades não redutoras de cadeias de amilose.

A maltose será posteriormente convertida em etanol e CO₂ pelas leveduras durante a fermentação. Após cerca de uma hora de brassagem, a porção líquida obtida pode ser chamada de mosto. Este é clarificado por um processo de filtração que no caso da cerveja artesanal utiliza os resíduos da casca dos grãos do malte utilizado na brassagem (Barth, 2013).

O mosto é então fervido com a finalidade de esterilizá-lo, para eliminação de micro-organismos indesejados, para precipitar proteínas que turvariam a bebida e para volatilizar dimetilsufetos provenientes do malte que poderiam conferir aroma desagradável a cerveja. Quando o mosto atinge a temperatura de fervura, este recebe o lúpulo de amargor para que ocorra a isomerização dos α -ácidos em iso- α -ácidos conferindo amargor para cerveja. A fervura ocorre por aproximadamente uma hora, e a taxa de transformação dos α -ácidos em iso- α -ácidos é dependente da temperatura durante a fervura, do pH do meio e da densidade do mosto, ficando normalmente em menos de 50% na maioria dos casos (Malowicki; Shellhammer, 2005). Nos minutos finais da fervura, o mosto pode ainda receber a adição de lúpulo de aroma que vai conferir os voláteis relacionados ao sabor da cerveja. Na Tabela 2 podem ser

visualizados os compostos de amargor provenientes do lúpulo que contribuem para qualidade sensorial da cerveja.

Tabela 2: Compostos de amargor, limiar de percepção sensorial e concentração normalmente encontrada em cervejas tipo *Lager*.

Composto	Limiar ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^a	Concentração ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
cohumulona	17	1
humulona	21	2
adhumulona	21	1
<i>cis</i> -iso-cohumulona	7	31
<i>cis</i> -iso-humulona	10	33
<i>cis</i> -iso-adhumulona	8	11
<i>trans</i> -iso-cohumulona	19	15
<i>trans</i> -iso-humulona	20	14
<i>trans</i> -iso-adhumulona	15	5
colupulona	39	0
lupulona	35	0
adlupulona	37	0
cohulupona	8	7
ácido hulupínico	69	0
xanthohumol	10	0
isoxanthohumol	16	2
8-prenilnaringenina	8	0

Adaptado de: Haseleu; Intelmann; Hofmann, 2009. ^a Valores determinados em solução aquosa com 5% de etanol e pH 4.

Depois da fervura, o mosto esterilizado e lupulado é resfriado para uma temperatura abaixo de 30 °C para receber a inoculação das leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*). O mosto com as leveduras permanece a uma temperatura controlada de 6 a 18°C (dependendo do tipo de levedura e do tipo de cerveja que está sendo fabricada) por aproximadamente sete dias para que ocorra a fermentação.

O metabolismo da levedura exerce influência sobre os compostos voláteis do lúpulo presentes na cerveja, seja pela biotransformação de linalol, geraniol, β -citronelol, nerol e α -terpineol, seja pela produção de β -glicosidases, que podem aumentar a liberação de compostos glicosilados, como é o caso da liberação de linalol a partir do linalil beta-glicosídeo, caso este esteja presente. Sharp et al. (2017) demonstraram que o uso de enzimas exógenas é capaz de aumentar a quantidade de terpenos álcoois em extrato aquoso de lúpulo.

Na fermentação grande parte da maltose existente é convertida pelas leveduras em álcool e CO₂, de modo a se atingir uma atenuação na densidade do fermentado com produção do teor alcóolico desejado para o tipo de cerveja que está sendo produzido (tipicamente de 4 até 9% em volume).

Após a fermentação, a cerveja pode ser separada da biomassa de leveduras que ficam no fundo do fermentador (no caso de cervejas *Lager* e *Ale*) para dar início à etapa de maturação. Na maturação, a cerveja tem a sua temperatura aumentada alguns graus acima da temperatura da fermentação primária por mais 5 a 7 dias, a fim de estimular o metabolismo das leveduras remanescentes para reabsorverem produtos da fermentação que são indesejados na cerveja como é o caso das cetonas vicinais (2,3-butanodiona, 2,3-pentanodiona e 2,3-butanodiol). Se a etapa da maturação não for realizada, a presença destas substâncias pode conferir um sabor desagradável de manteiga na cerveja, o que diminui sua aceitação pelo consumidor. Após esta etapa a temperatura da cerveja é reduzida para valores entre 5 e 0 °C para favorecer a sedimentação das leveduras e clarificar a cerveja. Nesta etapa, a cerveja pode receber mais uma dose de lúpulos de aroma numa etapa chamada de lupulagem tardia ou *dry hopping*, que extrai a frio os compostos de aroma para a cerveja. Pequenas contribuições para o amargor podem ocorrer durante esta etapa devido à oxidação das humulonas e lupulonas em humulinonas e huluponas, conforme descreve o estudo de Algazzali e Shellhammer (2016).

Terminada a etapa de maturação, a cerveja é carbonatada e envasada. No caso da cerveja artesanal, geralmente ela é acondicionada em garrafas de vidro âmbar e adiciona-se uma quantidade extra de açúcar ou extrato de malte para que as leveduras restantes possam fermentar o açúcar adicionado, carbonatando a bebida na garrafa. A quantidade de açúcar adicionado varia conforme o estilo da cerveja. Por exemplo, uma cerveja tipo *Indian Pale Ale* deve conter cerca de 2 volumes de CO₂ por litro, o que pode ser obtido pela adição de 4,5 g de sacarose por litro. Após a adição de açúcar, a cerveja deve permanecer por mais sete dias na mesma temperatura utilizada na etapa de fermentação para que as leveduras remanescentes carbonatem a cerveja. Após este período, a cerveja está pronta para o consumo (Boulton, 2013). A Tabela 3 apresenta os principais compostos capazes de conferir sabor para cerveja.

Tabela 3: Compostos voláteis, limiar de percepção sensorial, concentração e descritor de aroma em cerveja.

Composto	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Limiar ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Característica Sensorial
<u>Terpenos^a</u>			
mirceno	0,7 - 1,1	9,5	balsâmico, especiarias ^c
linalol	4,0 - 10,5	1,7	floral-frutado ^c
geraniol	3,4 - 3,8	4	rosa, gerânio ^c
β -cariofileno	0,1 - 0,3	450 ^d	amadeirado e especiarias ^c
α -humuleno	0,2 - 0,7	450 ^d	amadeirado e especiarias ^c
epóxido de humuleno I	5,3 - 7,1	-	cedro
<u>Ésteres^b</u>			
acetato de etila	10^4 - $6,0 \cdot 10^4$	$3,0 \cdot 10^4$	doce
acetato de isoamila	$5,0 \cdot 10^2$ - $5,0 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$	banana
octanoato de etila	10^2 - $1,5 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^2$	maçã, frutas
<u>Álcoois^b</u>			
etanol	$2,0 \cdot 10^7$ - $8,0 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$	alcoólico
3-metilbutanol	$3,0 \cdot 10^4$ - $7,0 \cdot 10^4$	$7,0 \cdot 10^4$	alcoólico, vínico
2-feniletanol	$8,0 \cdot 10^3$ - $3,5 \cdot 10^4$	$1,25 \cdot 10^5$	rosa, perfume
<u>Dicetonas Vicinais^b</u>			
2,3-butanodiona	10,0 - $4,0 \cdot 10^2$	70,0 - $1,5 \cdot 10^2$	manteiga
2,3-pentanodiona	10,0 - $1,5 \cdot 10^2$	$9,0 \cdot 10^2$	manteiga
2,3-butanodiol	$5,0 \cdot 10^4$ - $1,5 \cdot 10^5$	$4,5 \cdot 10^6$	borracha
<u>Sulfurosos^b</u>			
sulfeto de hidrogênio	1,0 - 20	5	ovo podre
dimetil sulfeto	10,0 - $1 \cdot 10^2$	30	pipoca doce
dimetil trissulfeto	$1,0 \cdot 10^{-2}$ - 0,8	0,1	cebola

^a Fonte: Kishimoto et al., 2005. ^b Fonte: Baxter; Hughes, 2001. ^c Fonte: Eyres; Dufour, 2009. ^d Limiar determinado em água.

1.3.2 A importância do lúpulo para estabilidade da espuma da cerveja

Os α -ácidos do lúpulo não apenas contribuem para o amargor da cerveja, mas também desempenham um papel essencial para formação e estabilização dos complexos de espuma da bebida. O teor de compostos voláteis pouco hidrofílicos é um fator-chave para a estabilização, pois esses compostos tendem a deixar a cerveja e se concentrarem na espuma, aumentando assim sua estabilidade (Schonberger; Kostelecky, 2011). Os iso- α -ácidos são considerados um dos principais contribuintes para a melhoria da estabilidade da espuma, sendo observado que a iso-humulona fornece uma espuma mais

estável do que iso-cohumulona, pois a primeira apresenta menor solubilidade no pH da cerveja resultando na maior tendência em associar-se com outros componentes presentes na espuma (Diffor et al., 1978; Smith; Davidson; Wilson, 1998). Assim, cada um dos diferentes homólogos de iso- α -ácidos atua de maneira ligeiramente diferente, produzindo variações no grau de espuma de acordo com suas atividades de superfície (Evans; Sheehan, 2002).

Os principais processos relacionados com a formação de espuma e à sua estabilidade são: a formação de bolhas, drenagem de líquido da espuma para cerveja, coalescência de bolhas (junção de bolhas pela ruptura do filme entre elas) e desproporcionamento (passagem do gás de uma bolha pequena para uma bolha adjacente maior) (Schonberger; Kostelecky, 2011). Além disso, também contribuem para a estabilização da espuma algumas proteínas do malte capazes de formar uma película forte, flexível e coesiva, reduzindo a coalescência e o desproporcionamento. A presença de minerais em quantidades adequadas, conforme o estilo da cerveja, ajudam a formar complexos estabilizadores de espuma pela sua interação com os iso- α -ácidos.

O crescimento da proporção de proteínas e/ou iso- α -ácidos podem causar o aumento do teor espuma, assim como o valor de pH e o teor de etanol que também apresentam impacto na espuma de cerveja (Siebert, 2010). Outro aspecto importante é o uso de derivados dos α -ácidos, os tetrahydro-iso- α -ácidos, rho-iso- α -ácidos e hexahidro-iso- α -ácidos que possuem propriedades de potencializar e estabilizar a espuma, sendo cruciais para aumentar ainda mais o teor de espuma na cerveja, principalmente nos estilos *American Lager* e *Pilsen*, que apresentam menor teor de proteínas e iso- α -ácidos. Os hexahidro-iso- α -ácidos e tetrahydro-iso- α -ácidos são mais hidrofóbicos e, portanto, são estabilizantes fortes se comparados com os iso- α -ácidos e rho-iso- α -ácidos (Kunimune; Shellhammer, 2008). A Figura 21 ilustra as estruturas dos derivados dos α -ácidos empregados como estabilizadores de espuma da cerveja.

Figura 21: Estruturas químicas dos derivados dos α -ácidos: Hexahidro-iso-humulona, Tetrahydro-iso-humulona, Rho-iso-humulona e Isohumulona.

Adaptado de: Keukeleire, 1999.

Nesta introdução, apresentou-se uma revisão crítica e abrangente sobre o estado da arte em fitoquímica do lúpulo e sua relação com a qualidade da cerveja. Foram enfatizados aspectos químicos relacionados aos principais metabólitos do lúpulo e sua relação com as propriedades organolépticas da cerveja. Abordamos as principais vias biossintéticas para formação de humulonas, lupulonas, compostos fenólicos e óleos essenciais do lúpulo capazes de afetar a qualidade química e sensorial de cervejas. E finalmente apresentamos um overview da contribuição do lúpulo no processo cervejeiro.

Nas próximas etapas desta dissertação, serão apresentados os estudos de caracterização química que realizamos em dez amostras pertencentes a quatro variedades de lúpulos produzidos em diferentes regiões do Brasil, bem como os resultados da fabricação de quatro cervejas: i) empregando lúpulo nacional, ii) empregando lúpulo importado, iii) empregando lúpulo nacional adicionado de enzima β -glicosidase e iv) empregando lúpulo importado adicionado de enzima β -glicosidase.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

- Conhecer a composição química em termos de teor de umidade, humulonas, lupulonas e óleos essenciais de lúpulos cultivados no Brasil, com a finalidade de compará-los com a composição química de lúpulos importados.
- Com o lúpulo que apresentar os teores de óleos essencial e ácidos amargos mais semelhantes com os lúpulos importados, fabricar cervejas artesanais com e sem adição de β -glicosidase para comparar o perfil de voláteis destas cervejas com aquelas elaboradas com lúpulo importado, com e sem adição de β -glicosidase.

2.2 Específicos

- Nos lúpulos cultivados no Brasil quantificar, por cromatografia líquida de alta eficiência, o teor de cohumulona, n-+adhumulona, colupulona e n-+adlupulona.
- Nos lúpulos cultivados no Brasil quantificar, por hidrodestilação, o teor (% v/m) dos óleos essenciais.
- Caracterizar os óleos essenciais extraídos por cromatografia gasosa acoplada a detector espectrométrico de massas (GC-MS) e semi-quantificar (% área relativa) os componentes dos óleos essenciais identificados por cromatografia gasosa acoplada em detector de ionização em chama (GC-FID).
- Comparar a composição química dos lúpulos cultivados no Brasil com aquelas descritas na literatura.
- Com o lúpulo cultivado no Brasil que apresentar os teores de óleos essencial e ácidos amargos mais semelhantes com o lúpulo importado, fabricar quatro lotes de cerveja, empregando: i) lúpulo nacional, ii) lúpulo importado, iii) lúpulo nacional adicionado de enzima β -glicosidase e iv) lúpulo importado adicionado de enzima β -glicosidase.
- Investigar a composição química dos compostos voláteis das cervejas produzidas por microextração em fase sólida de headspace (HS-SPME) e GC-MS.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras de lúpulo

Os lúpulos nacionais utilizados nesta pesquisa foram das variedades Cascade, Chinook, Hallertauer e Columbus (safra de 2017). Para a fabricação da cerveja artesanal

foi utilizado o lúpulo da variedade Cascade safra 2018. As amostras (300 g de cada) foram gentilmente doadas, através de Termo de Transferência de Material, pela empresa Soluções Integradas para Agricultura. Os lúpulos foram enviados pela empresa na forma de flores desidratadas, em embalagens próprias para lúpulo e seladas a vácuo. Na Tabela 4 podem ser visualizados os locais de origem dos lúpulos. Uma vez recebidas, as amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C até a realização das análises. O período entre o recebimento das amostras e as análises não foi superior a trinta dias.

Tabela 4: Código, variedade e local de cultivo das amostras de lúpulo investigadas.

Código	Variedade	Local de cultivo
CA-1	Cascade	Araxá - MG
CA-2	Cascade	Bueno Brandão - MG
CA-3	Cascade	Guarapuava - PR
CA-4	Cascade	Gramado - RS
CH-1	Chinook	Carambeí - PR
CH-2	Chinook	Guarapuava - PR
CH-3	Chinook	Gramado - RS
CO-1	Columbus	Carambeí - PR
CO-2	Columbus	Guarapuava - PR
HT-1	Hallertauer	Gramado - RS

3.2 Amostras de cerveja

Para as etapas de otimização da extração dos voláteis da cerveja por HS-SPME foram adquiridas amostras de cerveja comercial tipo *Ale*, todas pertencentes ao mesmo lote. Estas foram congeladas em freezer a -20 °C até o momento das análises. O período entre o recebimento das amostras e as análises não foi superior a sete dias.

3.3 Fabricação das cervejas artesanais

Foram produzidas quatro cervejas artesanais tipo *Ale*: utilizando-se 100 % de malte tipo *Pilsen* (ECB 3-4) (Agrária, Brasil), lúpulo Cascade comercial peletizado (Yakima Chief Hops, USA) e lúpulo Cascade em flor cultivado no Brasil. A etapa de mosturação foi realizada após moagem do malte e adição de água na proporção de 3:1. A mistura foi mantida sob agitação constante segundo a seguinte rampa de temperatura: início em 50 °C por 15 min, seguido de um incremento de 1 °C min⁻¹ até 68 °C, permanecendo nesta temperatura por 60 min. Após, incremento de 1 °C min⁻¹ até 78 °C, permanecendo nesta temperatura por 5 min (Figura 22). A mosturação foi acompanhada pela realização do teste de iodo (2%) em placa de toque, para verificar a conversão do amido ao longo do processo. Uma vez que a mosturação foi finalizada, o mosto foi

resfriado em banho de gelo até alcançar a temperatura de 30 °C. A densidade do mosto (OG - *Original Gravity*) ao final do processo de mostura foi 1,045. A enzima β -glicosidase de amêndoas (EC número: 3.2.1.21, da MP Biomedicals, LLC, Ohio, USA), foi adicionada na etapa de refrigeração do mosto, na concentração de 250 U L⁻¹, em temperatura de 30 °C, sob agitação constante por 30 minutos (Sharp et al., 2016). Após o tratamento enzimático, o mosto foi inoculado com o fermento US-05 (Fermentis, USA) (*Saccharomyces cerevisiae*, > 6×10⁶ células viáveis mL⁻¹), e armazenado em câmara de fermentação por 7 dias a 18 °C, até alcançar uma densidade final (FG *Final Gravity*) de 1,010, o que corresponde a um ABV (*Alcohol by volume*) de 4,6%. Após a etapa de fermentação a cerveja foi maturada para reabsorção de cetonas vicinais por sete dias a 21 °C. Em seguida, a cerveja foi submetida ao processo de *cold crash* (etapa da produção cervejeira na qual a temperatura é diminuída para clarificar a bebida devido à decantação de leveduras e do material particulado) a 0 °C por mais sete dias. Finalmente, a cerveja foi acondicionada em garrafas de vidro âmbar de 500 mL e recebeu 5 g L⁻¹ de sacarose (~2,5 volumes de CO₂) e permaneceu por mais sete dias a 18 °C para carbonatação da cerveja na garrafa.

Figura 22: Curva de mostura empregada no preparo das cervejas artesanais.

Fonte: Autoria própria.

3.4 Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes: ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) da Merck; metanol (grau HPLC), éter etílico P.A, diclorometano P.A e ácido clorídrico 37% P.A, todos da Panreac (Barcelona, Espanha); ácido fosfórico 85% P.A, da Macron Fine Chemicals (USA); padrão certificado de α -ácidos e β -ácidos (ICE-3) da American Society of Brewing Chemists (ASBC, Minnesota, USA); padrão de alcanos

C₇ - C₃₀ (Supelco, Bellefonte, USA); β -glicosidase de amêndoa (EC number: 3.2.1.21), 5ku da MP Biomedicals (Ohio, EUA).

3.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software Statistica v.13 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

3.6 Preparo de amostras e análises cromatográficas

3.6.1 Humulonas e Lupulonas

As análises de α -ácidos (humulonas) e β -ácidos (lupulonas) seguiram o protocolo estabelecido pela American Society of Brewing Chemists (Hops-14, 2008), modificado pelo nosso grupo para redução das quantidades dos reagentes necessários em 50%. Uma alíquota de lúpulo de 5 g foi triturada em nitrogênio líquido e transferida para erlenmeyers de 125 mL cobertos com papel alumínio para extração. Foram adicionados 10 mL de metanol e 50 mL de éter dietílico sobre a amostra. A mistura foi submetida à agitação por 30 min com auxílio de uma barra magnética e agitador magnético. Em seguida, foram adicionados 20 mL de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ e a amostra foi agitada por mais 10 min. Em seguida, a amostra foi deixada em repouso para separação das fases e então foi retirada uma alíquota de 2,5 mL da fase sobrenadante (éterea) que foi transferida para um balão de 25 mL, e o volume do balão foi completado com metanol. Antes da injeção da amostra no cromatógrafo a líquido, esta foi filtrada em membrana filtrante de celulose (0,45 μ m). Para fins quantitativos, o padrão de α -ácidos e β -ácidos foi preparado conforme recomendações da American Society of Brewing Chemists (Hops-14, 2008).

Como cada lúpulo pode ter sido submetido a um grau diferente de secagem pelo produtor e, em função disso, pode apresentar diferentes teores de umidade, optou-se por expressar os resultados de α -ácidos e β -ácidos por grama de amostra a 10% de umidade. Para isso, foi determinada a umidade das amostras, conforme preconiza a American Society of Brewing Chemists (Hops-4, 2008). Neste método, a umidade é determinada utilizando-se estufa convencional a 103 °C e alíquotas de 2,5 g de lúpulo triturado. O lúpulo foi deixado na estufa por 1 h, resfriado em dessecador e pesado até que a diferença entre duas pesagens sucessivas fosse inferior a 1 mg.

Para análise das humulonas e lupulonas foi utilizado HPLC (marca Shimadzu, Modelo LC20AD, auto-injetor SIL20AHT e detector SPD-6AV) utilizando-se as

seguintes condições cromatográficas: injetor com *loop* para 10 μL de amostra, fase móvel composta de metanol, água e ácido fosfórico na proporção 85:17:0,25 (em volume) filtrada em membrana de 0,45 μm e desgaseificada em banho ultrassônico por 15 min, vazão da fase móvel 0,8 mL min^{-1} , coluna cromatográfica C18 (250 mm x 4 mm, 5 μm) a 22 °C e detector UV em 314 nm. Os analitos cohumolona, n-+adhumolona, colupulona e n-+adlupulona foram identificados pela co-injeção de padrões autênticos e quantificados com base nas áreas obtidas segundo as recomendações da American Society of Brewing Chemists (Hops-14, 2008). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.6.2 Óleos essenciais

A extração dos óleos essenciais foi realizada utilizando-se a técnica de hidrodestilação em um aparato de Clevenger modificado. Nessa etapa os óleos essenciais são arrastados pelo vapor d'água durante 4 horas, conforme preconiza a metodologia oficial da American Society of Brewing Chemists (Hops-13, 2008). Para preparar a amostra foram pesados aproximadamente 30 g de lúpulo, que foram triturados em nitrogênio líquido para uma adequada homogeneização. Posteriormente, a amostra triturada foi acondicionada em um balão de fundo redondo de 2 L, este foi preenchido com água destilada até a metade do seu volume, seguido da extração por arraste de vapor.

A quantificação dos principais componentes do óleo essencial foi realizada conforme a metodologia oficial da American Society of Brewing Chemists (Hops-17, 2008) utilizando-se um GC-FID. A amostra de óleo essencial foi diluída a 10% (em volume) em diclorometano e injetada GC-FID marca Shimadzu, modelo GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Os analitos foram separados em coluna capilar de sílica fundida VF-5ms (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm), sob as seguintes condições cromatográficas: injetor a 220 °C e razão de divisão de fluxo 1:50 (por 1,0 min), gás de arraste nitrogênio, hidrogênio e ar sintético a 0,6 mL min^{-1} , rampa de temperatura do forno iniciando a 50 °C (por 1 min), com incremento de 2 °C min^{-1} até 170 °C, seguido de incremento de 10 °C min^{-1} até 260 °C, detector a 280 °C. A quantificação foi realizada por % relativa da área dos componentes do óleo essencial.

A análise qualitativa (caracterização) dos componentes do óleo essencial foi realizada sob as mesmas condições cromatográficas descritas para o GC-FID, porém em um GC-MS, marca Shimadzu modelo GC-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) com

temperatura da interface a 280 °C, fonte de ionização por elétrons a +70 eV (35-350 m/z) e gás de arraste hélio. A identificação tentativa dos compostos do óleo essencial foi feita com base nas comparações dos espectros de massa obtidos com as amostras e os espectros de massa da NIST 2008, com similaridade mínima de 85% e com variação máxima de ± 10 nos valores dos Índices Lineares de Temperatura Programada (LTPRI). Para os cálculos dos LTPRI foi utilizada uma série homóloga de alcanos C₇-C₃₀. As análises foram realizadas em triplicata.

3.6.3 Extração de voláteis da cerveja

A extração dos voláteis da cerveja foi realizada por HS-SPME, utilizando-se frascos de 40 mL com tampa de rosca e septo (PTFE/silicone) e alíquotas de 10 mL de cerveja desgaseificadas em banho de ultrassom. Para aumentar a eficiência de extração dos voláteis, adicionou-se 2,7 g de cloreto de sódio às amostras de cerveja (efeito *salting-out*). A mistura foi então agitada em vortex por 1 minuto e submetida à extração por SPME em banho termostático, utilizando-se béquer encamisado para melhor controle de temperatura.

Foram testados cinco materiais de recobrimento de SPME com o objetivo de se escolher aquele com maior capacidade de extração dos voláteis presentes na cerveja: divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano 50/30 μm (DVB/CAR/PDMS), divinilbenzeno/polidimetilsiloxano 65 μm (DVB/PDMS), 100 μm polidimetilsiloxano (PDMS), 85 μm poliacrilato (PA) e carboxen/polidimetilsiloxano 85 μm (CAR/PDMS). Para escolha do material de recobrimento de SPME capaz de capturar os voláteis da cerveja de forma mais efetiva, as fibras foram testadas sendo expostas ao *headspace* das amostras sob as seguintes condições: tempo de equilíbrio 15 min, tempo de extração 30 min, temperatura de extração de 40 °C. Todas as fibras foram testadas em triplicata.

Após a extração, as fibras foram introduzidas no injetor do GC-MS para dessorção dos analitos utilizando-se as seguintes condições cromatográficas: injetor a 250 °C e sem divisão de fluxo, gás de arraste hélio a 0,6 mL min⁻¹, rampa de temperatura do forno: iniciando a 40 °C com incremento de 3 °C min⁻¹ até 196 °C, seguido de incremento de 20 °C min⁻¹ até 280 °C. A dessorção no injetor foi realizada por um período de 15 min. Após o procedimento de extração e dessorção, as fibras eram recondicionadas por 20 min a 250 °C para garantir a inexistência de picos nos brancos de corrida.

3.6.4 Preparo das amostras de cerveja artesanal

Para a fabricação das cervejas com lúpulo nacional, foi utilizado o lúpulo Cascade produzido no Brasil (CA-1), safra 2018, devido ao fato de ser o lúpulo com características químicas mais parecidas com as descritas na literatura para lúpulos desta variedade. Para fins de comparação, empregou-se também o lúpulo Cascade comercial (EUA). As amostras foram preparadas com e sem a adição de enzima β -glicosidase, com o objetivo de se comparar o perfil de voláteis das cervejas.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Umidades, α -ácidos e β -ácidos nos lúpulos cultivados no Brasil

As análises de α -ácidos e β -ácidos dos lúpulos foram realizadas por HPLC. A Figura 23 ilustra um cromatograma típico de alfa e beta ácidos do lúpulo por HPLC obtido em nosso laboratório.

Figura 23: Cromatograma típico da análise de α e β -ácidos do lúpulo por HPLC obtido em nosso laboratório. Da esquerda para direita: cohumolona, n-+adhumolona, colupulona e n-+adlupulona.

Fonte: Autoria própria.

Nas Tabelas 5a e 5b podem ser observados os resultados obtidos para os teores de umidade e de α -ácidos e β -ácidos nos lúpulos cultivados no Brasil. O lúpulo recém-colhido apresenta de 75% até 80% de umidade. Este alto teor de água dificulta a armazenagem e propicia o desenvolvimento de micro-organismos deteriorantes. Assim, a secagem do lúpulo fresco deve ser realizada para melhorar a sua conservação. Usualmente os produtores realizam esta secagem em temperaturas de 50 a 70 °C por 8 a 15 horas, resultando em um produto com uma umidade residual de 10 a 12%. Secagens

muito intensas são indesejadas, pois conduzem ao esfarelamento dos cones de lúpulo e a perda dos óleos essenciais (Agraria, 2018).

Dentre as amostras de lúpulo analisadas quanto ao teor de umidade, observou-se que nenhuma estava na faixa de secagem recomendada. A amostra Cascade cultivada em Guarapuava – PR apresentou secagem excessiva, enquanto os outros lúpulos, excesso de umidade. Esta é uma informação importante que revela falta de conhecimento técnico de secagem ou de formas de se fazer o controle de qualidade da secagem por parte dos produtores.

Tabela 5a: Teores de umidade para os diferentes lúpulos investigados.

Código	Umidade (%)
CA-1	14,30
CA-2	29,10
CA-3	12,80
CA-4	38,60
CH-1	21,30
CH-2	8,90
CH-3	28,40
CO-1	16,60
CO-2	24,20
HT-1	19,00

* CA-1: Cascade produzido em Araxá - MG; CA-2: Cascade produzido em Bueno Brandão - MG; CA-3: Cascade produzido em Guarapuava - PR; CA-4: Cascade produzido em Gramado - RS; CH-1: Chinook produzido em Carambeí - PR; CH-2: Chinook produzido em Guarapuava - PR; CH-3: Chinook produzido em Gramado - RS; CO-1: Columbus produzido em Carambeí - PR; CO-2: Columbus produzido em Guarapuava - PR; HT-1: Hallertauer produzido em Gramado – RS.

Como os lúpulos apresentavam valores muito diferentes de umidade e os resultados de α -ácidos e β -ácidos são expressos em gramas de α -ácidos e β -ácidos por 100 g de amostra, todos os resultados apresentados na Tabela 5b foram expressos para 10% de umidade. Em relação aos teores de ácidos amargos, a quantidade esperada segundo a literatura para a variedade Cascade é de 5,5 a 9% de α -ácidos e de 6 a 7,5% para os β -ácidos (Yakima Chief, 2018). As amostras que apresentaram teores de ácidos amargos mais próximos do relatado na literatura foram: CA-1 (5,09% de α -ácidos e 2,98% de β -ácidos) e CA-2 (5,47% de α -ácidos e 3,40% de β -ácidos), ambas produzidas em Minas Gerais.

Para a variedade Chinook, os teores esperados, segundo a literatura, variam de 11,5 a 15% de α -ácidos e de 3 a 4% de β -ácidos. Para a variedade Hallertauer, os teores esperados de α -ácidos e β -ácidos devem estar entre 3,5 a 6,5% de α -ácidos e 2,5 a 6,5%

de β -ácidos (Yakima Chief, 2018). Em relação ao Columbus, segundo a literatura, os teores devem estar entre 14,5 a 17,5% e 4,5 a 6% de α -ácidos e β -ácidos, respectivamente. Nenhuma das amostras analisadas dessas variedades apresentou os teores de ácidos amargos próximos ao relatado na literatura. Possivelmente, estes baixos valores de ácidos amargos devem-se ao fato de que os lúpulos fornecidos pelos produtores serem de primeira safra (*baby hops*), ou seja, as plantas ainda não haviam alcançado a maturidade suficiente para produzir teores de ácidos amargos semelhantes aos relatados na literatura. Além disso, sabe-se que os teores de ácidos amargos dependem também das condições de secagem, do clima e das práticas agrícolas no local de cultivo.

Tabela 5b: Teores de α -ácidos e β -ácidos para os diferentes lúpulos. Valores expressos para 10% de umidade.

Lúpulo	Cohumulona	n-+Adhumulona	Colupulona	n-+Adlupulona	(%) α -ácido	(%) β -ácido
CA-1	1,52 $\pm$ 0,04	3,33 $\pm$ 0,05	1,48 $\pm$ 0,07	1,35 $\pm$ 0,04	5,09 $\pm$ 0,06	2,98 $\pm$ 0,08
CA-2	1,41 $\pm$ 0,01	2,83 $\pm$ 0,02	1,44 $\pm$ 0,01	1,24 $\pm$ 0,01	5,47 $\pm$ 0,02	3,40 $\pm$ 0,01
CA-3	0,45 $\pm$ 0,00	1,53 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,00	2,04 $\pm$ 0,02	1,48 $\pm$ 0,01
CA-4	0,57 $\pm$ 0,01	1,98 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,02	3,74 $\pm$ 0,05	2,88 $\pm$ 0,04
CH-1	0,53 $\pm$ 0,02	2,08 $\pm$ 0,07	1,13 $\pm$ 0,03	1,06 $\pm$ 0,03	2,99 $\pm$ 0,07	2,51 $\pm$ 0,04
CH-2	0,47 $\pm$ 0,01	1,72 $\pm$ 0,02	1,11 $\pm$ 0,02	0,90 $\pm$ 0,01	2,17 $\pm$ 0,02	1,99 $\pm$ 0,02
CH-3	0,60 $\pm$ 0,01	2,20 $\pm$ 0,04	1,16 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,03	3,52 $\pm$ 0,04	2,71 $\pm$ 0,04
CO-1	0,57 $\pm$ 0,02	1,42 $\pm$ 0,07	0,73 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,02	2,15 $\pm$ 0,07	1,51 $\pm$ 0,03
CO-2	0,61 $\pm$ 0,01	2,13 $\pm$ 0,03	1,15 $\pm$ 0,02	0,97 $\pm$ 0,02	3,25 $\pm$ 0,03	2,51 $\pm$ 0,03
HT-1	0,16 $\pm$ 0,01	0,99 $\pm$ 0,05	0,74 $\pm$ 0,03	1,08 $\pm$ 0,05	1,28 $\pm$ 0,05	2,02 $\pm$ 0,06

* CA-1: Cascade produzido em Araxá - MG; CA-2: Cascade produzido em Bueno Brandão - MG; CA-3: Cascade produzido em Guarapuava - PR; CA-4: Cascade produzido em Gramado - RS; CH-1: Chinook produzido em Carambeí - PR; CH-2: Chinook produzido em Guarapuava - PR; CH-3: Chinook produzido em Gramado - RS; CO-1: Columbus produzido em Carambeí - PR; CO-2: Columbus produzido em Guarapuava - PR; HT-1: Hallertauer produzido em Gramado - RS.

4.2 Rendimento de óleo essencial nos lúpulos cultivados no Brasil

Os resultados de rendimento de óleo essencial dos lúpulos nacionais podem ser observados na Figura 24, usualmente expressos em mL/100g ou %v/m. A quantidade esperada, segundo a literatura (Yakima Chief, 2018), para a variedade Cascade é de 0,8 a 2,5%. As amostras que apresentaram o teor de óleo essencial dentro do relatado na literatura foram às cultivadas em Minas Gerais CA-1 (1,32%) e CA-2 (1,91%) e a cultivada em Gramado - RS CA-4 (1,26%). Para a variedade Chinook, o teor de óleo essencial esperado pode variar de 1,0 a 2,5%. A amostra CH-3 cultivada em Gramado - RS apresentou-se dentro do relatado na literatura (1,16%). A variedade Columbus apresenta rendimentos esperados entre 2,5 a 4,5% e, para as amostras analisadas dessa

variedade, tivemos valores entre 0,63% (CO-2) e 0,68% (CO-1). Portanto, ambas as amostras de Columbus apresentaram quantidades de óleo essencial abaixo do esperado. Por outro lado, para a variedade Hallertauer, os teores esperados de óleo essencial segundo literatura podem variar de 0,5 a 1,0%, e a amostra HT-1, do Rio Grande do Sul, apresentou 1% de óleo essencial, estando também dentro do relatado na literatura.

Vale apenas lembrar que, assim como discutido anteriormente para os α -ácidos e β -ácidos, os teores de óleo essencial no lúpulo também são afetados de forma geral por diversos fatores que vão desde a variedade do lúpulo, fatores edafoclimáticos, colheita no ponto de maturação correto e condições de secagem.

Figura 24: Resultados de rendimento de extração de óleos essenciais (% v/m) para os lúpulos cultivados no Brasil. Valores expressos para 10% de umidade.

*CA-1: Cascade produzido em Araxá - MG; CA-2: Cascade produzido em Bueno Brandão - MG; CA-3: Cascade produzido em Guarapuava - PR; CA-4: Cascade produzido em Gramado - RS; CH-1: Chinook produzido em Carambeí - PR; CH-2: Chinook produzido em Guarapuava - PR; CH-3: Chinook produzido em Gramado - RS; CO-1: Columbus produzido em Carambeí - PR; CO-2: Columbus produzido em Guarapuava - PR; HT-1: Hallertauer produzido em Gramado - RS.

4.3 Seleção do lúpulo nacional para fabricação da cerveja artesanal

Considerando-se os resultados das análises químicas anteriormente apresentadas, a amostra de lúpulo da variedade Cascade cultivada em Bueno Brandão - MG (CA-2) foi a que apresentou composição química de humulonas, lupulonas e rendimento de óleos essenciais mais parecido com o que é preconizado pela literatura. Porém, devido à disponibilidade de amostra, o Cascade cultivado em Araxá - MG (CA-1), que também apresentou composição química próxima do esperado, foi selecionado para os experimentos de fabricação da cerveja artesanal. Para isso, uma nova amostra do lúpulo Cascade CA-1, da safra 2018 (em flor), foi fornecida pelo produtor para que se

repetissem as análises, a fim de se comprovar a sua composição química em duas safras distintas. Além disso, uma amostra de lúpulo Cascade americano (peletizado) foi também adquirida e analisada para que a composição química dos lúpulos empregados na fabricação da cerveja artesanal fosse conhecida. Os resultados das análises das amostras de Cascade cultivado no Brasil e nos EUA podem ser observados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6: Teores de ácidos amargos nos lúpulos selecionados para a fabricação da cerveja artesanal. Valores expressos para 10% de umidade.

Lúpulo	Umidade	Cohumulona	Adhumulona	Colupulona	Adlupulona	α -ácido%	β -ácido%
Cascade - EUA	7,80	2,14 $\pm$ 0,01	4,30 $\pm$ 0,01	3,13 $\pm$ 0,01	2,88 $\pm$ 0,01	6,28 $\pm$ 0,01	5,86 $\pm$ 0,01
Cascade - Brasil 2017	14,30	1,52 $\pm$ 0,04	3,33 $\pm$ 0,05	1,48 $\pm$ 0,07	1,35 $\pm$ 0,04	5,09 $\pm$ 0,06	2,98 $\pm$ 0,08
Cascade - Brasil 2018	12,50	1,42 $\pm$ 0,01	2,78 $\pm$ 0,01	1,56 $\pm$ 0,01	1,27 $\pm$ 0,00	4,31 $\pm$ 0,01	2,90 $\pm$ 0,01

Pode-se observar que a amostra de lúpulo Cascade cultivado no Brasil - 2018 apresentou menor teor de alfa e beta ácidos totais, se comparada à safra de 2017 e ao lúpulo Cascade americano. Esta variação pode estar relacionada, como discutido anteriormente, a fatores edafoclimáticos e de manejo das plantas, bem como a determinação do ponto de colheita e procedimentos de secagem. Por outro lado, a quantidade de óleo essencial do lúpulo nacional safra 2018 é semelhante ao encontrado no ano de 2017, e também ao lúpulo americano.

Tabela 7: Rendimento de óleo essencial nos lúpulos selecionados para a fabricação da cerveja artesanal. Valores expressos para 10% de umidade.

Lúpulo	Rendimento (% v/m)
Cascade - EUA	1,26
Cascade - Brasil 2017	1,32
Cascade - Brasil 2018	1,18

4.4 Caracterização e quantificação dos componentes dos óleos essenciais dos lúpulos utilizados para a fabricação da cerveja

As análises por GC-MS das amostras de lúpulo Cascade - Brasil 2018 e Cascade - EUA revelaram a presença de 68 e 69 compostos voláteis, respectivamente. Na Figura 25 podem ser observados os cromatogramas obtidos com destaque para alguns compostos importantes para o aroma de lúpulos segundo a American Society of Brewing Chemists (Hops-17, 2008).

Figura 25: Cromatogramas dos óleos essenciais dos lúpulos Cascade selecionados para fabricação da cerveja, obtidos por GC-MS. Em destaque: 1= mirceno, 2= 2-metilbutil isobutirato 3= linalol, 4= geraniol, 5= β -cariofileno, 6= α -humuleno e 7= α -farneseno.

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 8 são apresentadas a caracterização por GC-MS e as semi-quantificações dos componentes dos óleos essenciais dos lúpulos Cascade nacional 2018 e americano.

Tabela 8: Caracterização e semi-quantificação dos óleos essenciais dos lúpulos Cascade - Brasil e Cascade - EUA, obtidas por GC-MS e GC-FID (% de área relativa). (continua)

COMPOSTOS	IR. CALC.	IR. LIT.	Δ	Cascade EUA	Cascade Brasil
Álcoois					
linalol	1103	1098	-5	$0,63 \pm 0,05^a$	$0,48 \pm 0,00^b$
fenchol	1123	1119	-4	$0,04 \pm 0,01^a$	$0,03 \pm 0,00^b$
<i>trans</i> -pinocarveol	1147	1139	-8	$0,01 \pm 0,01^b$	$0,01 \pm 0,00^a$
<i>trans</i> - <i>p</i> -ment-2-en-1-ol	1150	1144	-6	$0,01 \pm 0,00^a$	$0,01 \pm 0,00^b$
borneol	1179	1172	-7	$0,01 \pm 0,00^a$	$0,01 \pm 0,00^b$
terpinen-4-ol	1183	1174	-9	$0,01 \pm 0,00^a$	$0,01 \pm 0,00^a$
geraniol	1256	1258	2	$0,85 \pm 0,01^a$	-
intermedeol	1625	-	-	$0,04 \pm 0,00^a$	$0,03 \pm 0,00^b$
alfa-acoreno	1635	1634	-1	$0,07 \pm 0,00^a$	$0,04 \pm 0,00^b$
cariofilenol	1646	-	-	$0,10 \pm 0,00^a$	$0,04 \pm 0,00^b$
tau-cadinol	1649	1640	-9	$0,15 \pm 0,00^a$	$0,12 \pm 0,00^b$
delta-cadinol	1655	1645	-10	$0,02 \pm 0,00^a$	$0,02 \pm 0,00^b$
alfa-cadinol	1663	1653	-10	$1,03 \pm 0,01^a$	$0,92 \pm 0,02^b$
Aldeídos					
geranial	1279	1270	-9	$0,06 \pm 0,00^a$	$0,01 \pm 0,00^b$
tetradecanal	1612	1606	-6	$0,05 \pm 0,00^a$	$0,02 \pm 0,00^b$
Cetonas					
2-undecanona	1299	1294	-5	$0,21 \pm 0,00^a$	$0,13 \pm 0,00^b$
2-dodecanona	1360	1350	-10	$0,02 \pm 0,00^b$	$0,06 \pm 0,00^a$
2-tridecanona	1506	1497	-9	$0,18 \pm 0,00^a$	$0,09 \pm 0,00^b$

Tabela 8: (continuação)

2-pentadecanona	1704	1694	-10	$0,08 \pm 0,01^a$	$0,04 \pm 0,00^b$
hexahidrofarnesona	1849	1846	-3	-	$0,04 \pm 0,00^b$
Diterpenos					
<i>m</i> -canforeno	1957	1960	3	$0,12 \pm 0,00^b$	$0,13 \pm 0,00^a$
<i>p</i> -canforeno	1993	1994	1	$0,05 \pm 0,00^b$	$0,05 \pm 0,00^a$
Ésteres					
butirato de isobutila	916	920	4	$0,06 \pm 0,00^b$	$0,10 \pm 0,00^a$
isobutirato de isoamila	1014	1020	6	$0,09 \pm 0,01^b$	$0,17 \pm 0,01^a$
isobutirato de 2-metilbutila	1017	1014	-3	$0,56 \pm 0,01^b$	$0,63 \pm 0,01^a$
isovalerato de 2-metilbutila	1110	1110	0	$0,12 \pm 0,01^b$	$0,20 \pm 0,01^a$
octanoato de metila	1128	1126	-2	$0,03 \pm 0,00^b$	$0,05 \pm 0,00^a$
geranato de metila	1325	1324	-1	$0,21 \pm 0,00^b$	$0,28 \pm 0,01^a$
acetato de geranila	1382	1383	1	$0,10 \pm 0,00^b$	$0,97 \pm 0,01^a$
isobutirato de geranila	1517	1511	-6	$0,69 \pm 0,01^a$	$0,45 \pm 0,01^b$
palmitato de metila	1936	1927	-9	$0,01 \pm 0,00^a$	-
linolenato de metila	2113	2105	-8	$0,03 \pm 0,00^a$	-
Monoterpenos					
alfa-pineno	934	934	0	$0,09 \pm 0,00^b$	$0,17 \pm 0,00^a$
canfeno	951	949	-2	$0,05 \pm 0,00^a$	$0,02 \pm 0,00^b$
beta-pineno	980	975	-5	$0,28 \pm 0,01^b$	$1,22 \pm 0,02^a$
beta-mirceno	996	990	-6	$45,69 \pm 0,38^b$	$58,56 \pm 0,73^a$
ocimeno	1027	1026	-1	$0,01 \pm 0,00^b$	$0,03 \pm 0,00^a$
limoneno	1031	1033	2	$0,42 \pm 0,01^a$	$0,39 \pm 0,01^b$
beta-felandreno	1033	1029	-4	$0,19 \pm 0,00^a$	$0,19 \pm 0,01^a$
<i>trans</i> -beta-ocimeno	1050	1048	-2	$0,10 \pm 0,01^a$	$0,05 \pm 0,01^b$
<i>trans</i> -dihidro-ocimeno	1057	-	-	$0,13 \pm 0,00^b$	$0,16 \pm 0,02^a$
alfa-terpinoleno	1083	1089	6	-	$0,01 \pm 0,00^b$
Óxidos					
perileno	1101	1101	0	$0,06 \pm 0,00^b$	$0,24 \pm 0,00^a$
óxido de cariofileno	1589	1584	-5	$0,60 \pm 0,01^b$	$0,67 \pm 0,02^a$
epóxido de humuleno I	1602	1593	-9	$0,23 \pm 0,01^b$	$0,29 \pm 0,01^a$
epóxido de humuleno II	1618	1609	-9	$1,11 \pm 0,01^b$	$1,50 \pm 0,04^a$
epóxido de humuleno III	1635	1626	-9	$0,13 \pm 0,02^a$	$0,12 \pm 0,00^a$
Sesquiterpenos					
alfa-copaeno	1371	1370	-1	$0,10 \pm 0,00^a$	$0,05 \pm 0,00^b$
alfa-cubeneno	1377	1373	-4	$0,31 \pm 0,00^a$	$0,16 \pm 0,00^b$
<i>cis</i> -alfa-bergamoneto	1415	1415	0	$0,01 \pm 0,00^b$	$0,07 \pm 0,00^a$
beta-cariofileno	1423	1419	-4	$7,16 \pm 0,10^a$	$3,65 \pm 0,06^b$
beta-ylangeno	1431	1421	-10	$0,04 \pm 0,00^a$	-
6,9-guaiadieno	1433	-	-	$0,08 \pm 0,00^b$	$0,12 \pm 0,00^a$
<i>trans</i> -alfa-bergamoneto	1434	1430	-4	$0,46 \pm 0,00^a$	$0,43 \pm 0,01^b$
alfa-himachaleno	1452	1450	-2	$0,01 \pm 0,00^b$	$0,01 \pm 0,00^b$
alfa-humuleno	1455	1455	0	$25,41 \pm 0,39^a$	$14,50 \pm 0,26^b$
allo-aromadendreno	1465	1460	-5	-	$0,02 \pm 0,00^a$
4,5-di-epi-aristolocheno	1467	1467	0	$0,02 \pm 0,00^a$	-

Tabela 8: (conclusão)

gama-muroleno	1478	1473	-5	$0,92 \pm 0,01^a$	$0,51 \pm 0,01^b$
alfa-muroleno	1482	1472	-10	$0,12 \pm 0,00^a$	$0,06 \pm 0,00^b$
<i>trans</i> -beta-bergamoteno	1486	1480	-6	$0,06 \pm 0,00^a$	$0,05 \pm 0,00^b$
beta-selineno	1493	1487	-6	$1,31 \pm 0,02^a$	$0,87 \pm 0,02^b$
zingibereno	1496	1493	-3	$0,12 \pm 0,00^a$	$0,06 \pm 0,00^b$
alfa-selineno	1500	1492	-8	$1,62 \pm 0,02^a$	$1,21 \pm 0,02^b$
alfa-farneseno	1510	1508	-2	$0,96 \pm 0,01^a$	$0,98 \pm 0,02^a$
beta-bisaboleno	1512	1505	-7	$0,04 \pm 0,00^a$	$0,04 \pm 0,00^a$
gama-cadineno	1522	1513	-9	$0,99 \pm 0,01^a$	$0,53 \pm 0,01^b$
delta-cadineno	1526	1518	-8	$0,35 \pm 0,00^a$	$0,20 \pm 0,00^b$
calameneno	1525	1516	-9	-	$0,02 \pm 0,00^b$
beta-sesquifelandreno	1535	1525	-10	$0,08 \pm 0,00^a$	$0,04 \pm 0,00^b$
omega-cadineno	1537	1528	-9	$0,14 \pm 0,00^a$	$0,08 \pm 0,00^b$
alfa-cadineno	1547	1539	-8	$0,07 \pm 0,00^a$	$0,05 \pm 0,00^b$
alfa-calacoreno	1549	1540	-9	$0,01 \pm 0,00^b$	$0,02 \pm 0,00^a$

* **IR. CALC.:** Índice de retenção calculado; **IR. LIT.:** Índice de retenção encontrado na literatura; Δ : Variação dos índices de retenção obtida por: **IR. LIT. - IR. CALC.** Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas com $p < 0,05$ por teste de ANOVA e Tukey.

No total foram identificados no Cascade - EUA 9 monoterpenos (13%), 24 sesquiterpenos (35%), 2 diterpenos (3%), 13 álcoois (19%), 10 ésteres (14%), 2 aldeídos (3%), 5 óxidos (7%) e 4 cetonas (6%). Em relação ao Cascade - Brasil, foram identificados 10 monoterpenos (15%), 24 sesquiterpenos (35%), 2 diterpenos (3%), 12 álcoois (18%), 8 ésteres (12%), 2 aldeídos (3%), 5 óxidos (7%) e 5 cetonas (7%). Observam-se diferenças na constituição das amostras, como por exemplo, beta-ylangeno, geraniol, palmitato de metila, linolenato de metila e 4,5-di-epi-aristolocheno que não foram encontrados na amostra Cascade - Brasil, possivelmente devido às mesmas questões levantadas anteriormente, isto é, diferentes manejos, tipo de solo, processos de secagem e ao fato de que o lúpulo brasileiro não passou pelo processo de peletização. Como esperado, a classe majoritária presente nos lúpulos analisados se deve aos sesquiterpenos.

As análises quantitativas (% relativa de área) dos compostos presentes foram realizadas por GC-FID, utilizando-se como base o perfil cromatográfico obtido no GC-MS e os índices de retenção. Observou-se que ambos os óleos essenciais dos lúpulos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes, porém com variações qualitativas e quantitativas nos compostos importantes para o aroma e sabor.

Os teores de β -mirceno encontrados para o lúpulo Cascade - EUA e Cascade - Brasil foram 45,69% e 58,56%, respectivamente. Este composto é importante por que

ele confere um aroma pungente de lúpulo fresco na cerveja (notas de aroma balsâmico, mofado e especiarias). Porém, se presente em alta quantidade, proporciona um sabor descrito na literatura como áspero e desagradável. Os lúpulos classificados como nobres, isto é, de aroma e sabor intensos, apresentam teores de mirceno e humuleno invertidos, enquanto que nas variedades comuns os teores de mirceno são usualmente superiores ao de humuleno. Além disso, os produtos de degradação ou oxidação do mirceno podem gerar compostos importantes para o aroma e sabor como o linalol e geraniol. Os sesquiterpenos como o β -cariofileno, α -humuleno e seus respectivos epóxidos proporcionam sabores agradáveis para a cerveja. Os teores obtidos desses compostos para o Cascade - EUA e Cascade - Brasil foram 7,16% e 3,65% para o β -cariofileno e de 25,41% e 14,50% para o α -humuleno. Os monoepóxidos e diepóxidos de humuleno produzem sabor e aroma especiais para cerveja (cedro e especiarias). Em relação aos cariofilenos, estes tendem a apresentar maiores teores em variedades aromáticas do que em lúpulos de amargor. O β -cariofileno apresenta aroma amadeirado e de especiarias enquanto seu epóxido de cariofileno é geralmente associado com notas doces, frutadas, amadeiradas e herbais (Hopslis, 2018; Kuck, 2008; Beer, 2012).

O linalol e o geraniol são também importantes álcoois terpênicos no óleo essencial do lúpulo, pois devido aos seus baixos limiares de percepção de odor na cerveja estes são indicadores de aroma para os diferentes tipos de lúpulo que podem ser utilizados na fabricação de cerveja, contribuindo com notas florais. Em relação ao linalol, foram encontrados os teores de 0,63% e 0,48% para o lúpulo Cascade - EUA e Cascade - Brasil, respectivamente. O geraniol, por sua vez, foi encontrado apenas na amostra de lúpulo Cascade - EUA, com teor de 0,85%. A quantidade de farneseno encontrado no óleo essencial pode ser considerada uma característica distintiva entre alguns lúpulos. Geralmente este composto apresenta níveis baixos (<1%), porém pode estar presente em quantidades altas em lúpulos nobres. O α -farneseno, que contribui com notas de aroma amadeirado, cítrico e doce em cervejas, apresentou o teor de 0,96% para o lúpulo Cascade - EUA e 0,98% para a amostra Cascade - Brasil (Legends, 2011).

Ésteres, especialmente como o isobutirato de 2-metilbutila (notas frutadas), são encontrados geralmente acima do seu valor de limiar de percepção de odor. O teor encontrado desse composto foi de 0,56% e 0,63% para o lúpulo Cascade - EUA e Cascade - Brasil, respectivamente. Entretanto, a concentração deste composto na

cerveja pode ser influenciada fortemente pelas leveduras durante a fermentação, pela densidade do mosto, e pela quantidade de oxigênio disponível durante a fermentação.

4.5 Escolha da fibra para a extração de voláteis na cerveja por SPME

Finalizadas as análises químicas nos lúpulos, a seguir são apresentados os desenvolvimentos analíticos para otimização da extração dos compostos voláteis na cerveja. Para se investigar os voláteis presentes na cerveja artesanal produzida foram testados cinco diferentes materiais de recobrimento de fibras de SPME com objetivo de se escolher aquele com maior capacidade de extração de voláteis do *headspace* de uma cerveja artesanal comercial, utilizando-se como critério a área total de voláteis extraída e analisada por GC-MS.

A Figura 26 ilustra um cromatograma de voláteis de uma cerveja comercial tipo *Ale* por HS-SPME e GC-MS utilizando-se a fibra (CAR/DVB/PDMS), enquanto que a Figura 27 apresenta os valores médios de área total para cada uma das fibras testadas.

Figura 26: Cromatograma dos voláteis de uma cerveja artesanal comercial obtido por HS-SPME e GC-MS.

Fonte: Autoria própria.

Figura 27: Capacidade de extração dos voláteis da cerveja artesanal comercial utilizando diferentes fibras de SPME e GC-MS.

* O resultado é expresso como média das triplicatas da área total dos voláteis extraídos. Letras diferentes indicam diferenças estatísticas com $p < 0,05$ por teste de ANOVA e Tukey. Fonte: Autoria própria.

Devido à inexistência de diferenças estatísticas entre as fibras DVB/PDMS, CAR/CAR/PDMS e PA, a fibra CAR/DVB/PDMS foi escolhida por ser constituída de materias de diferentes polaridades. Em sua estrutura, a combinação dos poros do Carboxen (CAR) e do divinilbenzeno (DBV) juntamente com o filme líquido de PDMS formam meso/macroporos, conferindo a este material a capacidade de extrair uma maior variedade de compostos apesar de sua área total obtida ser levemente menor que a DVB/PDMS. Além disso, a fibra CAR/CAR/PDMS apresenta 2 cm de comprimento (a área total plotada na figura acima foi dividida por 2) enquanto as demais possuem 1 cm de comprimento.

4.6 Otimização das condições de extração dos voláteis da cerveja artesanal por HS-SPME

Uma vez escolhida fibra de SPME com maior capacidade de extração dos voláteis da cerveja, as condições experimentais foram otimizadas por delineamento composto central rotacional (DCCR), levando em consideração como resposta do planejamento à área total do cromatograma obtido por HS-SPME e GC-MS.

Inicialmente, foi realizada uma triagem de variáveis a fim de se investigar quais parâmetros influenciavam na extração de voláteis da cerveja, assim um

planejamento fracionário do tipo $2^{(4-1)}$ e com três repetições no ponto central foi executado. No total, 11 experimentos foram realizados de forma aleatória e na Tabela 9 podem ser observados os níveis, o domínio experimental e valores reais empregados neste planejamento.

Tabela 9: Planejamento fracionário $2^{(4-1)}$ para triagem de variáveis que afetam a extração de voláteis da cerveja por HS-SPME.

N.	X1	Volume de cerveja (mL)	X2	NaCl (g)	X3	Tempo de extração (min)	X4	Temperatura de extração (°C)	Área Total
1	-1	2,5	-1	1	-1	10	-1	30	3,704E+08
2	1	10	-1	1	-1	10	1	75	6,358E+08
3	-1	2,5	1	5	-1	10	1	75	5,982E+08
4	1	10	1	5	-1	10	-1	30	4,966E+08
5	-1	2,5	-1	1	1	120	1	75	1,190E+09
6	1	10	-1	1	1	120	-1	30	6,743E+08
7	-1	2,5	1	5	1	120	-1	30	6,451E+08
8	1	10	1	5	1	120	1	75	1,512E+09
9	0	6,2	0	3	0	65	0	53	1,185E+09
10	0	6,2	0	3	0	65	0	53	1,060E+09
11	0	6,2	0	3	0	65	0	53	1,126E+09

* **N.:** Número do experimento; **Área Total:** Área total em unidades arbitrárias obtida no cromatograma por GC-MS.

O diagrama de Pareto deste planejamento fracionário pode ser visualizado na Figura 28. Nele podemos observar que todas as variáveis apresentaram efeito positivo, entretanto, apenas os parâmetros curvatura, tempo e temperatura foram significativos para o modelo considerando-se $p = 0,05$.

Figura 28: Diagrama de Pareto para os efeitos das variáveis do planejamento fracionário para extração de voláteis em cerveja por HS-SPME. Resposta: área total, erro puro = $3,943E+15$.

Fonte: Autoria própria.

Com base nas informações obtidas no diagrama de Pareto do planejamento fracionário, as variáveis tempo de extração e temperatura de extração foram então otimizadas em um novo planejamento (DCCR) com pontos centrais e axiais conforme apresentado na Tabela 10.

Tabela 10: Planejamento completo 2^2 para otimização da extração dos voláteis da cerveja por HS-SPME.

N.	X1	Temperatura de extração (°C)	X2	Tempo de extração (min)	Área total
1	-1	30	-1	30	4,366E+08
2	1	67	-1	30	8,594E+08
3	-1	30	1	105	6,779E+08
4	1	67	1	105	1,362E+09
5	-1,41	22	0	68	4,771E+08
6	1,41	75	0	68	1,107E+09
7	0	49	-1,41	15	5,171E+08
8	0	49	1,41	121	1,198E+09
9	0	49	0	68	8,938E+08
10	0	49	0	68	1,071E+09
11	0	49	0	68	9,330E+08
12	0	49	0	68	1,007E+09

* **N.:** Número do experimento; **Área Total:** Área total em unidades arbitrárias obtida no cromatograma por GC-MS.

O diagrama de Pareto da Figura 29 para o planejamento completo 2^2 mostra que as variáveis otimizadas tempo e temperatura foram significativas para o modelo, apresentando efeitos positivos ($p = 0,05$), enquanto que a interação entre elas não foi significativa.

Figura 29: Diagrama de Pareto dos efeitos das variáveis do planejamento completo 2^2 para extração de voláteis em cerveja por HS-SPME. Resposta: área total, 2 fatores, 1 bloco, erro puro = 6,207E+15.

Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 11 podem ser observados os resultados de análise de variância (ANOVA) para o DCCR realizado. Verifica-se que a significância estatística da regressão ou $F_{\text{calculado}}$ (determinado pela razão entre a média dos quadrados da regressão pela média quadrática dos resíduos) foi de 36,91 e que quando comparado ao nível de significância de 95 % com o valor de F_{tabelado} , que neste caso, é de 4,39, temos que $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ cerca de 8,41 vezes indicando que a regressão foi estatisticamente significativa.

Tabela 11: Análise de variância (ANOVA) pelo método dos mínimos quadrados considerando os parâmetros tempo e temperatura de extração dos compostos voláteis de cerveja por HS-SPME.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F_{cal}	F_{tab}	$F_{\text{cal}}/F_{\text{tab}}$
Regressão	9,42E+17	5	1,88E+17	36,91	4,39	8,41
Resíduos	3,06E+16	6	5,10E+15			
Falta de ajuste	1,20E+16	3	4,00E+15	0,64	9,29	0,07
Erro puro	1,86E+16	3	6,21E+15			
Total	9,73E+17	11				
R^2	0,96					

A falta de ajuste do modelo é dada pela razão entre a média quadrática da falta de ajuste pela média quadrática do erro puro. Verificamos neste caso que $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$ cerca de 14,51 vezes, assim o modelo não apresenta indícios de falta de ajuste. A Figura 30 ilustra a superfície de resposta e o gráfico de contorno dos pontos experimentais efetuados. Com base na superfície de resposta, foram realizadas repetições (duplicatas) na região mais próxima do ponto ótimo ($X_1 = +1,41$ e $X_2 = +1,41$), limitado pelas condições experimentais. O ponto ótimo provavelmente está localizado em uma maior temperatura e tempo, este não foi encontrado pelo fato da alta temperatura já utilizada (75°C) para compostos que são considerados voláteis.

Figura 30: Superfície de resposta e gráfico de contorno para a otimização dos parâmetros tempo (min) e temperatura (°C) de extração dos voláteis da cerveja por HS-SPME.

Fonte: Autoria própria.

A Tabela 12 apresenta os dados experimentais das duplicatas que foram realizadas na região próxima do ponto ótimo.

Tabela 12: Duplicata experimental na região próxima do ponto ótimo.

N.	X1	Temperatura de Extração (°C)	X2	Tempo de Extração (min)	Área total
1	+1,41	75	+1,41	121	1,45E+09
2	+1,41	75	+1,41	121	1,37E+09
Média da Área Total		1,41(± 0,0567)E+09			

* N.: Número do experimento; **Área Total:** Área total em unidades arbitrárias obtida no cromatograma por GC-MS.

O polinômio que descreve a superfície de resposta obtida é dado por:

$$\begin{aligned} \text{Área Total} = & 9,76E + 08(\pm 74978) + 2,50E + 08(\pm 10589) * X_2 - 9,0E \\ & + 07(\pm 69216) * X_2^2 + 2,13E + 08(\pm 8576) * X_1 - 5,71E \\ & + 07(\pm 773059) * X_1^2 + 6,53E + 07(\pm 75) * X_1 * X_2. \end{aligned} \quad (1)$$

Substituindo-se o ponto $X_1 = +1,41$ e $X_2 = +1,41$ na equação (1) calcula-se a área total prevista de $1,47(\pm 0,000780) E+09$. Assim, observa-se que o valor previsto e o experimental, que foi de $1,41(\pm 0,0567) E+09$, são muito próximos, comprovando-se que o modelo é estatisticamente significativo, mas não preditivo (um modelo preditivo deve apresentar F_{cal}/F_{tab} da Regressão ≥ 10).

4.7 Análises de voláteis das cervejas artesanais produzidas

Após a determinação das condições mais próximas do ponto ótimo de extração, os voláteis das cervejas artesanais produzidas utilizando-se tanto o Cascade - EUA quanto o Cascade - Brasil, foram identificados por GC-MS. O número total de compostos identificados é apresentado na Tabela 13.

Tabela 13: Cervejas artesanais produzidas e número de voláteis identificados.

Codificações	Nº de Voláteis identificados
Cerveja/Lúpulo brasileiro + β -glicosidase	70
Cerveja/Lúpulo brasileiro	69
Cerveja/Lúpulo americano + β -glicosidase	67
Cerveja/Lúpulo americano	69

Os compostos voláteis identificados nas cervejas foram divididos segundo suas classes químicas e suas áreas brutas dos cromatogramas ($\times 10^6$) podem ser observadas na Tabela 14.

Tabela 14: Identificação e áreas brutas ($\times 10^6$) dos cromatogramas obtidos por HS-SPME e GC-MS para voláteis presentes nas cervejas produzidas. (continua)

COMPOSTO	IR. CALC.	IR. LIT.	Δ	CAS	Cerveja/Lúpulo brasileiro	Cerveja/Lúpulo brasileiro + β -glicosidase	Cerveja/Lúpulo americano	Cerveja/Lúpulo americano + β -glicosidase
Ácidos								
ácido hexanoico	1.015	1.014	-1	142-62-1	19,41 $\pm$ 3,20 ^b	9,65 $\pm$ 1,70 ^c	34,58 $\pm$ 1,66 ^a	12,38 $\pm$ 0,85 ^c
ácido octanoico	1.228	1.226	-2	124-07-2	398,88 $\pm$ 82,65 ^a	253,05 $\pm$ 5,47 ^b	242,67 $\pm$ 22,36 ^b	286,74 $\pm$ 13,92 ^b
ácido nonanoico	1.307	1.307	0	112-05-0	19,38 $\pm$ 0,96 ^{a,b}	21,15 $\pm$ 2,48 ^a	14,47 $\pm$ 2,08 ^c	15,10 $\pm$ 1,09 ^{b,c}
ácido decanoico	1.405	1.404	-1	334-48-5	368,03 $\pm$ 14,48 ^a	263,23 $\pm$ 20,76 ^b	250,76 $\pm$ 25,49 ^b	242,83 $\pm$ 16,20 ^b
ácido dodecanoico	1.580	1.576	-4	143-07-7	127,39 $\pm$ 40,44 ^{a,b}	74,32 $\pm$ 4,41 ^b	120,77 $\pm$ 4,06 ^{a,b}	134,17 $\pm$ 20,58 ^a
ácido tetradecanoico	1.778	1.775	-3	544-63-8	51,60 $\pm$ 21,54 ^b	54,09 $\pm$ 17,89 ^b	72,57 $\pm$ 11,90 ^{a,b}	97,91 $\pm$ 18,20 ^a
ácido hexadecanoico	1.980	1.979	-1	57-10-3	18,31 $\pm$ 11,03 ^a	4,18 $\pm$ 2,53 ^a	8,34 $\pm$ 1,52 ^a	8,77 $\pm$ 1,22 ^a
Álcoois								
pentanol	764	764	0	71-41-0	56,02 $\pm$ 8,26 ^a	63,82 $\pm$ 9,80 ^a	56,65 $\pm$ 1,60 ^a	69,42 $\pm$ 1,79 ^a
2-etilhexanol	1.034	1.030	-4	104-76-7	1,63 $\pm$ 0,53 ^a	0,78 $\pm$ 0,08 ^b	0,35 $\pm$ 0,09 ^b	0,56 $\pm$ 0,26 ^b
2-octen-1-ol	1.071	1.069	-2	18409-17-1	1,45 $\pm$ 0,52 ^a	0,94 $\pm$ 0,25 ^a	-	-
octanol	1.076	1.076	0	111-87-5	2,95 $\pm$ 1,20 ^a	1,47 $\pm$ 0,28 ^{a,b}	0,95 $\pm$ 0,28 ^b	1,09 $\pm$ 0,42 ^b
linalol	1.102	1.101	-1	78-70-6	-	1,11 $\pm$ 0,61 ^a	1,31 $\pm$ 0,13 ^a	1,50 $\pm$ 0,84 ^a
álcool feniletílico	1.129	1.129	0	60-12-8	64,45 $\pm$ 13,56 ^b	107,03 $\pm$ 1,78 ^a	116,14 $\pm$ 15,06 ^a	105,60 $\pm$ 9,72 ^a
2-nonen-1-ol	1.172	1.171	-1	31502-14-4	3,54 $\pm$ 1,08 ^a	2,52 $\pm$ 0,17 ^{a,b}	1,08 $\pm$ 0,30 ^b	1,84 $\pm$ 1,05 ^{a,b}
nonanol	1.176	1.173	-3	143-08-8	3,48 $\pm$ 1,35 ^a	2,95 $\pm$ 0,46 ^a	0,75 $\pm$ 0,28 ^a	1,11 $\pm$ 0,60 ^a
nerolidol	1.563	1.565	2	142-50-7	8,26 $\pm$ 0,46 ^a	3,58 $\pm$ 1,21 ^c	5,32 $\pm$ 0,06 ^{b,c}	6,36 $\pm$ 1,62 ^{a,b}
intermedeol	1.620	-	-	-	2,59 $\pm$ 0,39 ^a	2,86 $\pm$ 0,32 ^a	1,81 $\pm$ 0,09 ^b	1,12 $\pm$ 0,25 ^b
alfa-cadinol	1.630	1.630	0	481-34-5	-	-	2,70 $\pm$ 0,11 ^a	1,07 $\pm$ 0,37 ^b
tetradecanol	1.681	1.676	-5	112-72-1	11,71 $\pm$ 3,82 ^b	15,17 $\pm$ 3,29 ^{a,b}	18,78 $\pm$ 1,46 ^a	18,54 $\pm$ 2,02 ^a
farnesol	1.721	1.722	1	106-28-5	6,23 $\pm$ 1,44 ^b	4,03 $\pm$ 0,68 ^b	6,70 $\pm$ 1,26 ^b	13,02 $\pm$ 2,46 ^a
hexadecanol	1.884	1.882	-2	36653-82-4	10,42 $\pm$ 4,82 ^b	10,18 $\pm$ 3,65 ^b	23,01 $\pm$ 6,32 ^a	28,32 $\pm$ 1,60 ^a

Tabela 14: (continuação)

Aldeídos								
heptanal	906	901	-5	111-71-7	0,72±0,14 ^a	0,66±0,23 ^a	-	-
benzaldeído	967	963	-4	100-52-7	2,48±0,20 ^b	4,32±1,26 ^{a,b}	0,61±0,22 ^c	5,01±0,95 ^a
octanal	1.006	1.004	-2	124-13-0	3,99±1,53 ^a	2,75±0,38 ^{a,b}	1,81±0,34 ^{a,b}	1,55±0,62 ^b
fenilacetaldeído	1.052	1.051	-1	122-78-1	1,11±0,21 ^{a,b}	1,19±0,46 ^a	-	0,72±0,15 ^{a,b}
2-octenal	1.064	1.064	0	2548-87-0	0,82±0,26 ^a	0,89±0,40 ^a	-	-
nonanal	1.107	1.104	-3	124-19-6	9,59±2,66 ^a	7,71±2,61 ^a	8,13±1,50 ^a	9,75±5,89 ^a
2-nonenal	1.163	1.159	-4	18829-56-6	1,12±0,35 ^a	0,72±0,13 ^a	-	-
decanal	1.209	1.205	-4	106-32-1	34,31±8,08 ^a	24,94±0,73 ^{a,b}	17,38±2,93 ^b	23,75±9,00 ^{a,b}
2-decenal	1.266	1.263	-3	3913-81-3	2,44±0,43 ^a	2,32±0,26 ^a	2,51±0,18 ^a	1,52±0,26 ^b
undecanal	1.310	1.308	-2	112-44-7	7,69±0,86 ^a	7,20±0,36 ^{a,b}	4,59±0,82 ^b	6,39±2,42 ^{a,b}
dodecanal	1.411	1.407	-4	112-54-9	3,63±0,69 ^{a,b}	4,53±0,24 ^a	2,05±0,38 ^b	3,12±1,56 ^{a,b}
2-dodecenal	1.471	1.462	-9	20407-84-5	3,55±0,98 ^b	3,15±0,73 ^b	5,88±0,23 ^a	-
Cetonas								
beta-damascenona	1.381	1.381	0	23726-93-4	6,39±0,24 ^a	6,94±0,83 ^a	6,92±0,64 ^a	5,65±1,30 ^a
geranilacetona	1.451	1.455	4	3796-70-1	10,63±1,13 ^a	7,46±1,34 ^a	8,48±0,24 ^a	8,07±2,04 ^a
2-pentadecanona	1.699	1.694	-5	2345-28-0	1,65±0,36 ^a	1,69±0,6 ^a	2,58±0,16 ^a	2,18±0,40 ^a
hexahidrofarnesil acetona	1.842	1.846	4	68607-88-5	0,56±0,15 ^a	1,10±0,55 ^a	0,96±0,13 ^a	0,94±0,04 ^a
2-heptadecanona	1.902	1.901	-1	2922-51-2	0,54±0,26 ^c	0,89±0,35 ^{b,c}	1,62±0,34 ^{a,b}	2,09±0,57 ^a
Ésteres								
acetato de isobutila	785	781	-4	110-19-0	1,69±0,79 ^a	1,08±0,36 ^{a,b}	1,79±0,36 ^a	-
butanoato de etila	804	806	2	105-54-4	2,30±0,97 ^a	0,99±0,15 ^a	1,82±0,05 ^a	1,28±0,58 ^a
acetato de isoamila	877	876	-1	123-92-2	24,21±8,48 ^a	14,24±1,12 ^a	20,12±0,80 ^a	13,78±4,97 ^a
acetato de amila	879	880	1	624-41-9	3,91±1,69 ^a	3,28±0,72 ^a	4,79±0,47 ^a	2,48±0,70 ^a
hexanoato de etila	1.002	999	-3	123-66-0	33,03±11,2 ^a	17,82±0,6 ^b	19,92±0,06 ^{a,b}	11,38±3,90 ^b
heptanoato de etila	1.100	1.093	-7	106-30-9	1,25±0,37 ^a	1,50±0,32 ^a	0,98±0,08 ^{a,b}	0,52±0,24 ^b

Tabela 14: (continuação)

octanoato de etila	1.198	1.195	-3	106-32-1	127,29±29,77 ^a	114,13±1,16 ^a	72,62±0,70 ^b	64,77±12,52 ^b
acetato de fenetila	1.260	1.256	-4	103-45-7	32,26±2,50 ^b	38,28±2,06 ^a	41,45±2,30 ^a	32,35±1,10 ^b
nonanoato de etila	1.297	1.294	-3	123-29-5	2,72±0,60 ^{a,b}	3,69±0,44 ^a	1,22±0,06 ^c	1,78±0,93 ^{b,c}
geranato de metila	1.324	1.324	0	1189-09-9	0,75±0,09 ^c	2,36±0,50 ^a	1,38±0,08 ^b	0,81±0,13 ^{b,c}
octanoato de isobutila	1.348	1.348	0	5461-06-3	0,89±0,09 ^b	1,74±0,16 ^a	0,91±0,12 ^b	-
acetato de citronelila	1.351	1.351	0	150-84-5	2,69±0,63 ^b	5,10±0,11 ^a	4,34±0,10 ^a	2,38±0,83 ^b
4-decenoato de etila	1.390	1.389	-1	76649-16-6	45,19±3,98 ^a	41,62±3,76 ^{a,b}	35,82±1,67 ^b	33,80±5,63 ^b
decanoato de etila	1.397	1.398	1	110-38-3	59,10±3,63 ^a	40,32±4,35 ^b	28,52±2,40 ^c	23,78±4,25 ^c
caprilato de isoamila	1.448	1.450	2	2035-99-6	4,04±0,59 ^{a,b}	4,98±1,04 ^a	3,48±0,56 ^b	2,83±0,53 ^b
dodecanoato de etila	1.597	1.597	0	106-33-2	37,94±5,29 ^a	16,38±0,59 ^c	25,19±6,44 ^{b,c}	29,22±2,69 ^{a,b}
tetradecanoato de etila	1.796	1.796	0	124-06-1	39,35±25,55 ^a	25,42±6,33 ^a	14,88±6,15 ^a	31,52±7,17 ^a
farnesil acetato	1.835	1.837	2	4128-17-0	3,14±1,17 ^a	3,28±1,47 ^a	4,54±0,83 ^a	6,54±3,24 ^a
pentadecanoato de etila	1.896	1.897	1	41114-00-5	9,34±3,78 ^b	8,80±2,21 ^b	10,32±0,89 ^b	26,03±1,15 ^a
hexadecanoato de metila	1.927	1.927	0	112-39-0	1,04±0,37 ^b	1,27±0,57 ^{a,b}	0,73±0,22 ^b	1,99±0,47 ^a
9-hexadecenoato de etila	1.973	1.977	4	54546-22-4	4,44±1,34 ^a	2,87±0,56 ^a	2,46±0,56 ^a	2,88±0,77 ^a
hexadecanoato de etila	1.995	1.990	-5	628-97-7	18,95±7,83 ^b	14,87±5,13 ^b	29,12±1,02 ^{a,b}	43,54±6,05 ^a
linolenato de metila	2.098	2.099	1	12-63-0	1,11±0,33 ^a	0,90±0,38 ^a	1,28±0,26 ^a	3,71±0,99 ^a
Fenóis								
4-vinilguaiaicol	1.318	1.309	-9	7786-61-0	5,49±0,34 ^a	5,76±1,74 ^a	5,25±0,78 ^a	5,71±1,40 ^a
Lactonas								
gama-nonolactona	1.368	1.368	0	104-61-0	9,14±0,87 ^a	8,10±1,25 ^{a,b}	7,06±0,46 ^b	7,28±0,83 ^{a,b}
Monoterpenos								
beta-mirceno	990	990	0	123-35-3	0,55±0,14 ^a	0,33±0,04 ^a	0,73±0,20 ^a	0,25±0,08 ^a
<i>o</i> -cimenol	1.024	1.022	-2	527-84-4	0,39±0,12 ^a	0,39±0,21 ^a	0,37±0,25 ^a	0,05±0,00 ^a
limoneno	1.028	1.028	0	138-86-3	0,25±0,02 ^a	0,16±0,07 ^a	0,27±0,16 ^a	0,23±0,08 ^a
beta-felandreno	1.029	1.029	0	555-10-2	-	-	-	0,12±0,06 ^a

Tabela 14: (conclusão)

beta-ocimeno	1.048	1.050	2	3779-61-1	-	-	0,11±0,01 ^a	0,10±0,01 ^a
alfa-terpinoleno	1.085	1.089	4	586-62-9	-	-	0,35±0,04 ^a	0,20±0,03 ^b
Óxidos								
epóxido de humuleno II	1.610	1.606	-4	19888-34-7	18,06±0,48 ^a	14,97±2,24 ^a	6,08±1,52 ^b	4,70±0,96 ^b
epóxido de alloaromadendreno	1.637	1.631	-6	85760-81-2	15,20±2,11 ^b	21,08±1,77 ^a	14,78±0,50 ^b	14,63±1,04 ^b
Sesquiterpenos								
alfa-humuleno	1.456	1.456	0	6753-98-6	-	-	1,63±0,21 ^a	-
alfa-farneseno	1.505	1.505	0	502-61-4	1,32±0,26 ^a	1,81±0,15 ^a	1,73±0,11 ^a	1,30±0,29 ^a
alfa-calacoreno	1.541	1.540	-1	21391-99-1	3,29±0,22 ^a	2,03±0,40 ^b	2,51±0,45 ^{a,b}	2,46±0,27 ^b
cadaleno	1.675	1.675	0	483-78-3	3,29±0,06 ^b	5,01±0,59 ^a	2,07±0,25 ^c	2,34±0,38 ^c

* **IR. CALC.:** Índice de retenção calculado; **IR. LIT.:** Índice de retenção encontrado na literatura; Δ : Variação dos índices de retenção obtida por: **IR. LIT. - IR. CALC.**; **CAS:** Número CAS do composto; Letras diferentes indicam diferenças estatísticas com $p < 0,05$ por teste de ANOVA e Tukey.

É importante destacar que compostos precursores de aroma na forma de agliconas ligadas em carboidratos podem estar presentes no lúpulo e são em geral terpenos oxigenados, como por exemplo, álcoois monoterpênicos como o linalol. A hidrólise das ligações glicosídicas e a liberação dessas agliconas durante o processo de produção da cerveja pode aumentar a liberação desses compostos da bebida intensificando o aroma (Sharp; Steensels; Shellhammer, 2017). Os glicosídeos constituem cerca de 82,6% da fração solúvel em água presente nas resinas duras do lúpulo, sendo que 92,4% dessa fração é composta de glicose que majoritariamente se apresenta na forma de β -D-glicose com uma aglicona em C1 (55% da fração de glicose), conforme representado na Figura 31 (Ting; Kay; Ryder, 2009).

Figura 31: Representação da β -D-glicose com uma aglicona em C1.

Adaptado de: Ting; Kay; Ryder, 2009.

Na pesquisa realizada com o uso da enzima β -glicosidase constatou-se um aumento estatisticamente significativo na área bruta de alguns terpenoides oxigenados. Para a cerveja produzida com lúpulo cultivado no Brasil e enzima, linalol ($1,11 \times 10^6$), geranato de metila ($2,36 \times 10^6$) e acetato de citronelila ($5,10 \times 10^6$) apresentaram aumento estatístico significativo, em comparação com as áreas destes mesmos compostos na cerveja produzida com lúpulo cultivado no Brasil sem adição da enzima (zero, $0,75 \times 10^6$ e $2,69 \times 10^6$, respectivamente). Por outro lado, para a cerveja com lúpulo americano e enzima, observou-se diferença estatística significativa apenas para o composto farnesol ($13,02 \times 10^6$), em comparação com a área deste mesmo composto encontrada na cerveja produzida com lúpulo americano sem adição da enzima ($6,70 \times 10^6$).

As maiores áreas encontradas para os diferentes terpenos oxigenados presentes nas cervejas produzidas com adição da enzima sugere a presença de terpenos glicosilados em ambos os lúpulos testados.

A seguir, apresenta-se uma breve discussão sobre a importância dos compostos voláteis encontrados nas cervejas produzidas, considerando-se as suas classes químicas e suas características sensoriais (obtidas da base de dados Pherobase, Flavornet e Thegoodscent).

Ácidos

A presença de ácidos orgânicos na cerveja está relacionada principalmente à ação das leveduras e, neste caso, suas quantidades dependem da eficiência da fermentação (Baxter; Hughes, 2001). Os ácidos orgânicos identificados nas amostras de cerveja analisadas possuem como descritor de aroma notas de gorduroso e oleoso. Nesta classe, o ácido octanoico presente na cerveja produzida com lúpulo cultivado no Brasil, foi o que apresentou maior área ($398,88 \times 10^6$). Além de notas de aroma como gorduroso, esse composto também apresenta descritores de queijo, fresco e musgo. O ácido hexadecanoico, encontrado na cerveja produzida com lúpulo cultivado no Brasil e enzima, foi o que apresentou menor área ($4,18 \times 10^6$).

Álcoois e Ésteres

O sabor/aroma final da cerveja é devido principalmente a compostos produzidos durante a fermentação que consistem em intermediários metabólicos das leveduras. Álcoois superiores e ésteres são elementos-chave produzidos pelas leveduras que irão determinar a qualidade da cerveja, contribuindo com aromas agradáveis (Pires et al., 2014). Os álcoois superiores são aqueles constituídos por mais de dois átomos de carbono, e sua formação durante a fermentação ocorre por meio da descarboxilação de cetoácidos intermediários da biossíntese de aminoácidos, seguida da redução de aldeídos pela desidrogenase alcoólica. O uso de temperaturas de fermentação mais elevadas ($> 18^\circ\text{C}$) e grande biomassa de leveduras aumenta a produção desses álcoois, que contribuem para a percepção alcoólica e a sensação de aquecimento no palato (Gutierrez, 1993). A principal nota de aroma dos álcoois identificados nas cervejas produzidas é o floral e, entre esses compostos, o álcool feniletílico (notas de floral, rosa e mel) presente na cerveja produzida com lúpulo americano apresentou a maior área

($116,14 \times 10^6$), enquanto que o 2-etilhexanol (floral, cítrico, fresco, oleoso e doce) presente na mesma cerveja apresentou o menor valor ($0,35 \times 10^6$).

Os ésteres encontrados na cerveja são formados no citoplasma das leveduras por condensação enzimática de ácidos orgânicos e álcoois (Pires et al., 2014). Dentre os ésteres identificados podemos destacar: acetato de isoamila (frutado, doce e banana), acetato de isobutila (frutado, doce e banana), acetato de fenetila (frutado, floral, rosa e mel), hexanoato de etila (frutado, doce, abacaxi e verde) e octanoato de etila (frutado, ceroso, damasco e banana). Dentre esses compostos, o octanoato de etila contido na cerveja produzida com lúpulo cultivado no Brasil foi o que apresentou maior área ($127,29 \times 10^6$). O acetato de isobutila, presente na cerveja produzida com lúpulo cultivado no Brasil e enzima, foi o que apresentou menor área ($1,08 \times 10^6$).

Aldeídos

A presença de aldeídos na cerveja está relacionada tanto ao metabolismo das leveduras quanto a processos oxidativos. O aumento da concentração de compostos como o 2-nonenal durante o envelhecimento da cerveja é acompanhado da presença e intensificação de “sabores de envelhecido” que lembram papelão. A formação de aldeídos pode ocorrer por meio de uma grande diversidade de rotas, tais como: oxidação enzimática, auto-oxidação e foto-oxidação (Baert et al., 2012). Os aldeídos identificados nas cervejas produzidas mostraram tendência de aroma descrito como verde e, entre eles, o decanal (verde, floral, cítrico e ceroso) encontrado na cerveja com lúpulo cultivado no Brasil, apresentou o maior valor de área ($34,31 \times 10^6$). Por outro lado, o benzaldeído encontrado na cerveja produzida com lúpulo americano, mostrou o menor valor ($0,61 \times 10^6$).

Cetonas

As cetonas estão presentes em baixas quantidades na cerveja e nessa classe pode-se destacar a beta-damascenona, uma cetona terpênica. Esse composto apresenta um limiar de percepção muito baixo ($0,02 - 0,09 \text{ ng g}^{-1}$ em água) com notas frutadas e florais, sendo considerada como um composto importante para o aroma da bebida. Acredita-se que a beta-damascenona é formada por catálise ácida, convertendo poliois (triois alênicos) derivados de transformações enzimáticas do carotenoide neoxantina. Os poliois precursores da beta-damascenona podem se acumular como glico-conjugados na

cerveja fresca sendo então liberados por hidrólise ácida durante o envelhecimento da bebida (Chevance et al., 2002). Dentre as poucas cetonas identificadas, a geranilacetona (floral, verde, frutado e rosa) presente na cerveja produzida com lúpulo cultivado no Brasil, apresentou o maior valor de área ($10,63 \times 10^6$). A 2-heptadecanona contida na mesma cerveja mostrou o menor valor ($0,54 \times 10^6$). A maior área de beta-damascenona foi encontrada na cerveja produzida com lúpulo cultivado no Brasil e enzima ($6,94 \times 10^6$), enquanto que a menor observou-se na cerveja produzida com lúpulo americano e enzima.

Fenóis

Os polifenóis em geral não são compostos que atuam de forma significativa para o aroma da cerveja, porém, o composto 4-vinilguaiacol pode contribuir para o aspecto final da bebida. O odor desse composto é descrito como amadeirado e de especiarias, e seu limiar de percepção é de 0,2-0,4 mL L⁻¹. O 4-vinilguaiacol é produzido por decomposição enzimática ou térmica do ácido ferrúlico presente na casca do malte de cevada (McMurrough et al., 1996). A maior área para este composto foi observada na cerveja produzida com lúpulo cultivado no Brasil e adição de enzima ($5,76 \times 10^6$), enquanto que a menor encontrou-se na cerveja produzida com lúpulo americano ($5,25 \times 10^6$).

Lactonas

As lactonas são importantes compostos de aroma que ocorrem tanto em frutas como em produtos fermentados. A γ -nonalactona foi encontrada nas cervejas produzidas e é conhecida por ser um composto de aroma ativo na bebida (Garbe; Lange; Tressl, 2001). Esse composto possui notas de coco, ceroso e manteiga, com limiar de percepção de 30-65 $\mu\text{g L}^{-1}$ e podendo ser encontrado na cerveja em níveis de até 84 $\mu\text{g L}^{-1}$. A produção de lactonas é geralmente o resultado da oxidação e degradação de ácidos graxos no interior do peroxissoma das leveduras. Existem três principais reações catalisadas por enzimas para formação de lactonas a partir de ácidos graxos: hidroxilação, α/β -oxidação e ciclização (Hotchko, 2014). A cerveja produzida com lúpulo cultivado no Brasil apresentou o maior valor de área para este composto ($9,14 \times 10^6$), enquanto que na cerveja produzida com lúpulo americano observou-se o menor valor ($7,06 \times 10^6$).

Monoterpenos e Sesquiterpenos

Hidrocarbonetos terpênicos tais como mirceno, α -humuleno e β -cariofileno são introduzidos na cerveja durante a lupulagem, mas como são compostos hidrofóbicos, apresentam limitada solubilidade no mosto e na cerveja. O β -mirceno, α -humuleno e β -cariofileno são os principais voláteis do lúpulo, entretanto, na cerveja raramente são encontrados em concentrações aprevisíveis, pois durante a produção da cerveja são perdidos por evaporação, como por exemplo, na fervura do mosto ou durante a liberação de CO_2 na etapa de fermentação (Rettberg; Biendl; Garbe, 2018). Na classe dos monoterpenos, encontrou-se a maior área para o composto β -mirceno (especiarias, apimentado e balsâmico), presente na cerveja produzida com lúpulo americano ($0,73 \times 10^6$). Já o composto *o*-cimeno (cítrico e herbal), presente na cerveja produzida com lúpulo americano e enzima, apresentou o menor valor de área ($0,05 \times 10^6$). Dentre os sesquiterpenos, o cadaleno presente na cerveja produzida com lúpulo cultivado no Brasil e enzima, apresentou a maior área ($5,01 \times 10^6$). O alfa-farneseno (amadeirado, cítrico, herbal e lavanda), encontrado na cerveja produzida com lúpulo americano e enzima, apresentou o menor valor ($1,30 \times 10^6$).

Óxidos

Apesar dos hidrocarbonetos terpênicos não contribuírem de forma significativa para o aspecto sensorial final da cerveja, seus óxidos formados durante o armazenamento da bebida ou na fervura do mosto podem ser encontrados no produto final como contribuintes para o sabor e aroma. Entre eles, o epóxido de humuleno II (cedro, mofo e feno) presente na cerveja produzida com lúpulo cultivado no Brasil, apresentou o maior valor de área ($18,06 \times 10^6$). A menor área para este composto ($4,70 \times 10^6$) foi encontrada na cerveja produzida com lúpulo americano e enzima (Rettberg; Biendl; Garbe, 2018).

5. CONCLUSÕES

Através da realização desta pesquisa, foi conhecida a composição química, em termos de teor de umidade, humulonas, lupulonas e óleos essenciais de lúpulos das variedades Cascade, Chinook, Columbus e Hallertauer, cultivados em diferentes regiões do Brasil.

As análises químicas das amostras de lúpulo cultivado no Brasil revelaram uma demanda, por parte dos produtores, de conhecimentos sobre secagem e conservação dos lúpulos, o que pode ser verificado pela falta de uniformidade dos teores de umidade das amostras.

A composição química dos lúpulos nacionais, para a maioria das amostras, foi diferente do que se esperava segundo dados da literatura. Isto pode ser explicado pelo fato de que a maior parte das amostras foram obtidas de plantas com menos de três anos de idade (*baby hops*), e que não alcançaram ainda sua maturidade para produção de lúpulo. Desta forma, recomenda-se a continuidade deste estudo, com plantas que já atingiram sua maturidade para se conhecer o perfil químico dos lúpulos cultivados no Brasil.

De todas as amostras de lúpulo investigadas, apenas as amostras da variedade Cascade produzida no estado de Minas Gerais (CA-1 e CA-2) apresentaram teores de óleo essencial e ácidos amargos semelhantes ao descrito na literatura. O lúpulo CA-1 foi então utilizado para fabricação de uma cerveja artesanal tipo *Ale* e o perfil de voláteis da cerveja produzida foi comparado com o perfil de voláteis de uma cerveja tipo *Ale* fabricada com lúpulo Cascade importado. Através deste experimento foi possível verificar que o lúpulo Cascade nacional pode ser utilizado para fabricação de cervejas, e que quando comparados os perfis de voláteis das cervejas, estes apresentaram diferenças de composição, o que sugere que o lúpulo cultivado no Brasil pode conferir aromas e sabores diferenciados se comparado com a cerveja produzida com lúpulo comercial. Recomenda-se a continuidade desta pesquisa com a realização de novos experimentos para avaliação sensorial das cervejas produzidas a fim de se confirmar esta hipótese.

O uso de β -glicosidase na fabricação das cervejas foi capaz de aumentar as áreas de alguns compostos voláteis importantes para o sabor das cervejas, o que sugere a existência de terpenos glicosilados nos lúpulos empregados na fabricação das cervejas,

de modo que este é um tema muito interessante que pode ser melhor investigado pela caracterização química destes terpenos glicosilados em trabalhos futuros.

6. PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Como perspectivas de trabalhos futuros, recomenda-se:

- A continuidade deste estudo, isto é, a determinação da composição química de lúpulos cultivados no Brasil, em termos de teor de umidade, humulonas, lupulonas e óleos essenciais, utilizando plantas maduras, com mais de três anos de idade.
- Realizar a fabricação de cervejas com lúpulos nacionais e importados, com a finalidade de se comparar o perfil de voláteis e o perfil sensorial das cervejas produzidas, a fim de se avaliar química e sensorialmente o potencial de uso de lúpulos cultivados no Brasil para fabricação de cervejas.
- Identificar e caracterizar quimicamente os terpenos glicosilados presentes no mosto cervejeiro produzido com lúpulos cultivados no Brasil, com a finalidade de elucidar suas estruturas químicas e quantidades.

7. REFERÊNCIAS

- ABSON, J. W.; SALEH, M. S. E.; WALKER, T. K. Further observations on the δ -resin of hops and a method for its estimation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 60, p. 42-46, 1954.
- ALGAZZALI, V.; SHELLHAMMER, T. Bitterness Intensity of Oxidized Hop Acids: Humulinones and Hulupones. **American Society of Brewing Chemists**, v. 74, n. 1, p. 36-43, 2016.
- ALMAGUER, C.; GASTL, M.; DRESEL, M.; HOFMANN, T.; BECKER, T. A study of the functionality of hop epsilon-resins as a novel brewing product, Oral presentation at the World Brewing Congress, Portland, OR. Abstract 14, 2012.
- ALMAGUER, C.; SCHONBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT ELKE K.; BECKER, T. Humulus lupulus – a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, n. 120, p. 289-314, 2014. DOI: 10.1002./jib.160.
- ARAÚJO, N. Variedade brasileira de lúpulo é descoberta na Serra da Mantiqueira. **Globo Rural**, 2016. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2016/05/variedade-brasileira-de-lupulo-e-descoberta-na-serra-da-mantiqueira.html>>. Acesso em: 30-01-2019.
- ASBC; EBC. Hop resin nomenclature. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 63, p. 286-288, 1957.
- ASHURST, P. R; ELVIDGE, J. A. The Chemistry of Hop Constituents. Parte XXVIII. The Structure of an Autoxidation Product of Humulone. **Journal of the Chemical Society (C)**, p. 675-676, 1966.
- BAERT, J. J.; DE CLIPPELEER, J.; HUGHES, P. S.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. On the Origin of free and Bound Staling Aldehydes in Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 11449-11472, 2012.
- BAMFORTH, W. C. **Beer is Proof God Loves Us**. FT Press, 2010. 237 p. ISBN: 0-13-706507-8.
- BAMFORTH, W. C. **Beer: Tap Into the Art and Science of Brewing**. 2. ed. New York: Oxford University Press, 2003. 233 p. ISBN: 0195154797.

BARTH, R. **The chemistry of beer: the science in the suds**. 1. ed. Nova Jersey: John Wiley & Sons, 2013. 330 p. ISBN: 978-1-118-67497-0.

BAXTER, E. D.; HUGHES, P. S. **Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects**. 1. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2001. 137 p. ISBN: 0-8 5404-58 8-0.

BEER, 2012. Disponível em: <<https://beersensoryscience.wordpress.com/tag/linalool/>>. Acesso em: 01-02-2019.

BEER-23. AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS (Beer-23), 2011. DOI: 10.1094/ASBCMOA-Beer-23.

BENITEZ, J. L.; FORSTER, A.; KEUKELEIRE, D.; MOIR, M.; SHARPE, F. R.; VERHAGEN, L. C.; WETWOOD, K. T. **Hops and Hop Products**. Hans Carl, Nuremberg, Duitsland, 1997. p. 185. ISBN 3-418-00756-2.

BICCHI, C.; JOULAIN, D. Techniques for preparing essential oils and aromatic extracts. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 33, p. 133-134, 2018. DOI: 10.1002/ffj.3433.

BIENDL, M. Hops and health. **Master Brewers Association of the Americas**, v. 46, 2009. DOI: 10.1094/TQ-46-2-0416-01.

BOCQUET L.; SAHPAZ, S.; HILBERT, J. L.; RAMBAUD C.; RIVIERE, C. *Humulus lupulus* L., a very popular beer ingredient and medicinal plant: overview of its phytochemistry, its bioactivity, and its biotechnology. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 5, p. 1047-1090, 2018. DOI: 10.1007/s11101-018-9584-y.

BOULTON, C. Encyclopedia of Brewing. 1. ed. A John Wiley & Sons, 2013. 716 p. ISBN 978-1-4051-6744-4

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing Science and practice**. 1. ed. New York: CRC Press, 2004. p. 255-305. ISBN: 0-8493-2547-1

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

CHAGAS, E.; GARCIA, L. Lúpulo, crescendo muito bem no Brasil. Revista da Cerveja, n. 36, p. 52-61, 2018. ISSN: 2319-0027. Disponível em: <

<https://revistadacerveja.com.br/especial-lupulo-crescendo-muito-bem-no-brasil/>>.

Acesso em: 30-01-2019.

CHEVANCE, F.; GUYOT-DECLERK, C.; DUPONT, J.; COLLIN, S. Investigation of the β -Damascenone Level in Fresh and Aged Commercial Beers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3818-3821, 2002.

CHIVA-BLANCH, G.; URPI-SARDA, M.; ROTCHÉS-RIBALTA, M.; ZAMORA-ROS, R.; LLORACH, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; ESTRUCH, R.; ANDRÉS-LACUEVA, C. Determination of resveratrol and piceid in beer matrices by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 5, p. 698-705, 2011.

DIECKMANN, R. H.; PALAMAND, S. R. Autoxidation of Some Constituents of Hops. I. The Monoterpene Hydrocarbon, Myrcene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 22, n. 3, p. 498-503, 1974.

DIFFOR, D. W.; LIKENS, S. T.; REHBERGER, A. J.; BURKHARDT, R. J. The Effect of Isohumulone/Isocohumulone Ratio on BeKeukeleireer Head Retention. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 36, p. 63-65. 1978. DOI: 10.1094/ASBCJ-36-0063.

DIMPFEL, W.; SUTER, A. Sleep improving effects of a single dose administration of a valerian/hops fluid extract - a double blind, randomized, placebo-controlled sleep-EEG study in parallel design using electrohypnograms. **European Journal of Medical Research**, v. 13, p. 1-5, 2008.

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

EVANS, D. E; SHEEHAN, M. C. Don't be Fobbed Off: The Substance of Beer Foam – A Review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 60, n. 2, p. 47-57, 2002.

EYRES, G.; DUFOUR J. P. Hop Essential Oil: Analysis, Chemical Composition and Odor Characteristics. In: Beer in health and Disease Prevention. Department of Food

Science, University of Otago, Dunedin, New Zealand: Elsevier, p. 239-254, 2009. ISBN: 978-0-12-373891-2.

FALCONE-FERREYRA, M. L.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, n. 222, p. 1-15, 2012.

FLAVORNET. Disponível: <<https://www.google.com/search?client=firefox-b-d&q=flavornet>>. Acesso em: 07-02-2019.

GARBE, L. A.; LANGE, H.; TRESSL, R. Biosynthesis of γ -Nonalactone in Yeast. **American Chemical Society**, v. 794, p. 176-182, 2001. DOI: 10.1021/bk-2001-0794.ch014.

GIJS, L.; PIRAPREZ, G.; PERPÈTE, P.; SPINLER, E.; COLLIN, S. Retention of sulfur flavours by food matrix and determination of sensorial data independent of the medium composition. **Food Chem**, v. 69, p. 319–330, 2000.

GOIRIS, K.; JASKULA-GOIRIS, B.; SYRYN, E.; VAN OPSTAELE, F.; DE ROUCK, G.; AERTS, G.; DE COOMAN, L. The flavoring potential of hop polyphenols in beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 72, n. 2, p. 135-142, 2014. DOI: 10.1094/ASBCJ-2014-0327-01.

GUTIERREZ, L. E. Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 3, p. 464-472, 1993.

HASELEU, G.; INTELMAAN, D.; HOFMANN, T. Structure determination and sensory evaluation of novel bitter compounds formed from β -acids of hop (*Humulus lupulus* L.) upon wort boiling. *Food Chemisrey*, v. 116, p. 71-81, 2009.

HAYDUCK, M. Über die bitteren und harzigen Bestandteile des Hopfens. **Wochenschrift für Brauerei**, v. 5, p. 937–947, 1888.

HEALEY, J. The Hops List: 265 Beer Hop Varieties From Around the World. 1 ed. Julian Healey, 2016. 550 p.

HOPS LIASION COMMITTEE. Recommendations concerning nomenclature of hop resin components. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 75, p. 340-342, 1969.

HOPS-13. AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS (Hops-13), 2008. DOI: 10.1094/asbcmoa-hops-13.

HOPS-14. AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS (Hops-14), 2008. DOI: 10.1094/asbcmoa-hops-14.

HOPS-17. AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS (Hops-17), 2008. DOI: 10.1094/asbcmoa-hops-17.

HOPS-4. AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS (Hops-4), 2008. DOI: 10.1094/asbcmoa-hops-4.

HOPSLIST, 2018. Disponível em: <<http://www.hopslist.com/hops/>>. Acesso em: 01-02-2019

HOTCHKO, Rachel Ann. **The Potencial Role of Aliphatic γ and δ -Lactones in Beer Fruit Aroma**. 2014. 97 p. Thesis (Master of Science in Food Science and Technology) - Oregon State University, 2014.

HOUGHS, J. S.; BRIGGS, D. E.; STEVENS, R.; YOUNG, T. W. **Malting and Brewing Science: Hopped Wort and Beer**. 2. ed. New York: Chapman and Hall, 1982. v. 2. 914 p. ISBN: 1461357276.

HOWARD, G. A.; SLATER C.A. Essential Oil of Hops. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 63, n. 6, p. 491-506, 1957.

HUGHES, P. S.; SIMPSON, W. J. Bitterness of congeners and stereoisomers of hop-derived bitter acids found in beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 54, n. 4, p. 234-237, 1996.

INUI, T.; TSUCHIYA, F.; ISHIMARU, M.; OKA, K.; KOMURA, H. Different beers with different hops. Relevant compounds for their aroma characteristics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 4758-4764, 2013.

JAHNSEN, V. J. Complexity of hop oil. **Nature**, v. 196, p. 474-475, 1962.

JASKULA, B.; KAFARSKI, P.; AERTS, G.; COOMAN, L. A kinetic Study on the isomerization of hop α -Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6408-6415, 2008.

JERKOVIC, V.; COLLIN, S. Fate of resveratrol and piceid through different hop processings and storage times. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 584-590, 2007.

KARABÍN, M.; HUDCOVÁ, T.; JELÍNEK, L.; DOSTÁLEK, P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. **Institute of Food Technologists**, v. 15, p. 542-567, 2016. DOI: 10.1111/1541-4337.12201

KEUKELEIRE, D. Fundamentals of Beer and Hop Chemistry. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 108-112, 1999

KISHIMOTO, T.; WANIKAWA, A.; KAGAMI, N.; KAWATSURA, K. Analysis of hop-derives terpenoids in beer and evaluation of their behavior using the stir bar-sorptive extraction method with GC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4701-4707, 2005.

KISHIMOTO, T.; WANIKAWA, A.; KONO, K.; SHIBATA, K. Comparison of the odor-active compounds in unhopped beer and beers hopped with different hop varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8855–8861, 2006.

KOETTER, U.; BIENDL, M. Hops (*Humulus lupulus*): A Review of its Historic and Medicinal Uses. **HerbalGram**, v. 87, p. 44-57, 2010.

KUCK, Luiza. **Cerveja: sabor e aroma**. 2008. 46f. (Trabalho acadêmico de Graduação em Química de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008. Disponível em: <https://quimicadealimentos.files.wordpress.com/2009/08/cerveja_sabor_e_aroma.pdf> Acesso em: 01-02-2018.

KUNIMUNE, T.; SHELLHAMMER, T. Foam-stabilizing Effects and Cling Formation Patterns of Iso-alpha-acids and Reduced Iso- α -acids in Lager Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8629-8634, 2008. DOI: 10.1021/jf8011079.

LEGENDS, 2011. Disponível em: <<http://beerlegends.com/farnesene-oil>>. Acesso em: 01-02-2019.

LERMUSIEAU, G.; COLLIN, S. Volatile sulfur compounds in hops and residual concentrations in beer – A review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 61, n. 3, p. 109–113, 2003.

MAGALHÃES, P. J.; VIEIRA, J. S.; GONÇALVES, L. M.; PACHECO, J. G.; GUIDO, L. F.; BARROS, A. A. Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpolypyrrolidone: characterization by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 19, p. 3258-3268, 2010. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.10.068

MALOWICKI, M. G.; SHELLHAMMER T. H. Isomerization and Degradation Kinetics of Hop (*Humulus lupulus*) Acids in a Model Wort-Boiling System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4434-4439, 2005.

McLAUGHLIN, I. R.; LEDERER, C.; SHELLHAMMER, T. H. Bitterness-Modifying Properties of Hop Polyphenols Extracted from Spent Hop Material. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 66, n. 3, p. 174-183, 2008.

MCMURROUGH I.; MADIGAN, D.; DONNELLY, D.; HURLEY, J.; DOYLE, A. M.; HENNIGAN, G.; MCNULTY, N. Control of Ferulic Acid and 4-Vinyl Guaiacol in Brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 102, p. 327-332, 1996.

MEHEUS, J.; VERZELE, M.; ALDERWEIRELDT, F. Humulinone. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, vol. 73, p. 268-274, 1964.

MEILGAARD, M. C. Flavor chemistry of beer. Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. **Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas**, v. 12, p. 151-168, 1975.

NACHEL, M.; ETTLINGER, S. **Beer For Dummies**. 2. ed. John Wiley & Sons, 2012. 360 p. ISBN: 1118120302.

NEVE, R. A. **Hops**. 1. ed. Springer, 1991. 266 p. DOI 10.1007/978-94-011-3106-3.

OPSTAELE, F. V.; PRAET, T.; AERTS, G.; DE COOMAN, L. Characterization of Novel Single-Variety Oxygenated Sesquiterpenoid Hop Oil Fractions via Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry/Olfactometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 44, p. 10555-10564, 2013. DOI: 10.1021/jf402496t.

PALMER, J. **How to brew: everything you need to know to brew great beer every time**. 4. ed. Brewers Publications, 2017. 582 p. ISBN-10: 1938469356.

PHEROBASE. Disponível em: <<http://www.pherobase.com/>>. Acesso em: 07-02-2019.

PIRES, E. J.; TEIXEIRA, J. A.; BRÁNYIK, T.; VICENTE, A. A. Yeast: the soul of beer's aroma - a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Institute for Biotechnology and Bioengineering**, v. 98, p. 1937-1949, 2014. DOI: 10.1007/s00253-013-5470-0.

PRAET, T.; OPSTAELE, F. V.; STEENACKERS, B.; DE BRABANTER, J.; DE VOS, D.; AERTS, G.; DE COOMAN, L. Changes in the hop-derived volatile profile upon lab scale boiling. **Food Research International**, v. 75, p. 1-10, 2015.

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

ROBERTS, T. R; WILSON, R. J. H. Hops. In: Handbook of Brewing. 2 ed. Taylor & Francis, p. 177-280, 2006.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 105-124, 2003. DOI: 10.1016/S0168-1605(03)00153-3.

SCHILD, E.; RAUM, H. Papierchromatographische Studienüber die Bittersäuren und Harze des Hopfens. **Brauwissenschaft**, v. 9, p. 150-160, 1956.

SCHONBERGER, C.; KOSTELECKY, T. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 3, p. 259-267, 2011. DOI: 10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x.

SHARP, D. C.; STEENSELS, J.; SHELLHAMMER, T. H. The effect of hopping regime, cultivar and β -glucosidase activity on monoterpene alcohol concentrations in wort and beer. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 123, p. 185-191, 2017.

SHARP, D. C.; VOLLMER, D.M.; QIAN, Y.; SHELLHAMMER, T.H. examination of glycoside hydrolysis methods for the determination of terpenyl glycoside contents of different hop cultivars. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 75, n. 2, p. 101-108, 2017.

SHARPE, F. R.; LAWS, D. R. J. The essential oil of hops - A Review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 87, p. 96-107, 1981.

SHELL, C. Chemistry of essential oil. In: Handbook of essential oils: science, technology and applications. 2 ed. CRC Press, 2015. 1128 p. ISBN 9781466590465.

SHELLHAMMER, T. H. Hop Flavor and Aroma. In: PROCEEDINGS OF THE 1ST INTERNATIONAL BREWERS SYMPOSIUM. Master Brewers Association of the Americas, 2009. p. 167-181. ISBN: 978-0-9770519-8-4.

SHELLHAMMER, T. Humulene, The Oxford Companion to Beer definition, 2018. Disponível em: <<https://beerandbrewing.com/dictionary/Rfckwe4MaC/>>. Acesso em 29-01-2019.

SIEBERT, K. Modeling beer foam behavior. In: 73RD ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS - Part of the Brewing Summit. Haffmans North America Inc, p. 17, 2010.

SIMPSON, W. J. Ionization behavior of hop compounds and hop-derived compounds. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 99, n. 4, p. 317-326, 1993. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1993.tb01169.x.

SMITH, R. J.; DAVIDSON, D.; WILSON, R. J. H. Natural Foam Stabilizing and Bittering Compounds Derived from Hops. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 56, n. 2, p. 52-57, 1998.

SPETSIG, L. O.; STENINGER, M. Hulupones, a new group of hop bitter substances. **Journal of the Institute Brewing**, v. 66, p. 413-417, 1960. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1960.tb01735.x

STEENACKERS, B.; COOMAN, L.; DIRK, D. V. 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.

STEVENS, J. F.; JONATHAN E. P. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! **Phytochemistry**, v. 65, p. 1317-1330, 2004. DOI: 10.1016/j.phytochem.2004.04.025.

STEVENS, R. The chemistry of hop constituents. **Chemical Reviews**, v. 67, p. 19-71, 1967. DOI: 10.1021/cr60245a002.

STEVENS, R.; ROBERTS, J. B.; WILLIAMS, I. H. Treatment of hops (*Humulus lupulus*, L.) with gibberellic acid: Effect of spraying with gibberellic acid on yield and composition. **Nature**, v. 191, p. 360-361, 1961.

STEVENS, R.; WRIGHT, D. Evaluation of hops. X. Hulupones and the significance of β -acids in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 67, p. 496-501, 1961. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1961.tb01830.x

TAGASHIRA, M.; WATANABE, M.; UEMITSU, N. Antioxidative activity of hop bitter acids and their analogs. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 59, n. 4, p. 740-742, 1995. DOI: 10.1271/bbb.59.740.

TAKOI, K.; ITOGA, Y.; KOIE, K.; KOSUGI, T.; SHIMASE, M.; KATAYAMA, Y.; NAKAYAMA, Y.; WATARI, J. The Contribution of Geraniol Metabolism to the Citrus Flavour of Beer: Synergy of Geraniol and β -Citronellol under Coexistence with Excess Linalool. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, n. 3, p. 251-260, 2010.

THEGOODSCENTS. Disponível em: <<http://www.thegoodscentscompany.com/>>. Acesso em: 07-02-2019.

TING, L. P.; KAY, S.; RYDER, D. The occurrence and Nature of Kettle Hop Flavor. In: PROCEEDINGS OF THE 1ST INTERNATIONAL BREWERS SYMPOSIUM. Master Brewers Association of the Americas, 2009. p. 25-36. ISBN: 978-0-9770519-8-4.

TING, P. L.; RYDER, D. S. The bitter, twisted truth of the hop: 50 years of hop chemistry. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 75, n. 3, p. 161-180, 2017. DOI: 10.1094/ASBCJ-2017-3638-01.

TSURUMARU, Y.; SASAKI, K.; MIYAWAKI, T.; UTO, Y.; MOMMA, T.; UMEMOTO, N.; MOMOSE, M.; YAZAKI, K. HIPT-1, a membrane-bound prenyltransferase responsible for the biosynthesis of bitter acids in hops. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 417, p. 393-398, 2012. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.11.125.

VERZELE, M. Centenary review: 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 92, p. 32-48, 1986. DOI: 10.1002/j.2050-0416.1986.tb04372.x.

VERZELE, M.; KEUKELEIRE, D. **Chemistry and Analysis of Hop and Beer Bitter Acids**. Amsterdam: Elsevier, 1991. v. 27. 417 p. ISBN: 0-444-88165-4.

WALKER, T.K.; ZAKOMORNY, M.; BLAKEBROUGH, N. 'Delta resin,' a water-soluble, bitter, bacteriostatic portion of resin of hops. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 58, p. 439-442, 1952.

WANNENMACHER, J.; GASTL, M.; BECKER, T. Phenolic substances in beer: structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and beer quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 4, p. 953-988, 2018. DOI: 10.1111/1541-4337.12352.

YAKIMA CHIEF, 2018. Disponível em: <<https://www.yakimachief.com/wp-content/uploads/Yakima-Chief-Hops-Varieties.pdf>> Acesso em: 01-02-2019.

ZAWADZKI, A.; ALLOO, C.; GROSSI, A. B.; DO NASCIMENTO, E. S. P.; ALMEIDA, L. C.; BOGUSZ JUNIOR, S.; SKIBSTED, L. H.; CARDOSO, D. R. Effect of hop β -acids as dietary supplement for broiler chickens on meat composition and redox stability. **Food Research International**, v. 105, p. 210-220, 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.10.072.