UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

MAXWELL RODRIGUES FERREIRA

AVALIAÇÃO DE ÁCIDOS AMARGOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE *Humulus lupulus* L.

Mogi das Cruzes, SP
2016

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

MAXWELL RODRIGUES FERREIRA

AVALIAÇÃO DE ÁCIDOS AMARGOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE *Humulus lupulus* L.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para a conclusão do curso.

Orientador: Prof. Dr. Luis Henrique Garcia Amoedo

Mogi das Cruzes, SP
2016

MAXWELL RODRIGUES FERREIRA

AVALIAÇÃO DE ÁCIDOS AMARGOS DE DIFERENTES VARIEDADES DE *Humulus lupulus* L.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Farmácia da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para a conclusão do curso.

Aprovado em _____

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof. Ms. Luiz Carlos da Silva
Universidade de Mogi das Cruzes – UMC

_____

Prof. Dr. Douglas Mascara
Universidade de Mogi das Cruzes - UMC

Dedico

Aos meus pais, aos colegas de classe de convivência na graduação e aos professores pelo conhecimento adquirido ao longo da graduação.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a minha família, pela grandiosa força concedida ao longo de mais uma jornada.
Ao Prof. Dr. Luis Henrique Garcia Amoedo, meu orientador, pelos ensinamentos, delicadeza e confiança a mim depositada.
À empresa em que trabalho, pela disponibilização de meus horários.
Aos membros da banca, aos professores Ms. Luiz Carlos da Silva e ao Dr. Douglas Mascara.
Aos colaboradores do Centro de Interdisciplinar de Investigação Bioquímica (CIIB), em especial a professora Dra. Kátia Cristina Ugolini Mugnol (CIIB) e ao professor Dr. Wagner Alves de Souza Judice (CIIB) por colaborar com este trabalho em determinado momento quando foi lhes solicitado ajuda.
Agradeço ao Julio Landmann diretor-sócio da Wallerstein, por me receber em seu escritório humildemente, pela disposição em querer ajudar, concedendo-me uma amostra do padrão analítico, além de conversar e adquirir novos conhecimentos.
Agradeço ao meu querido amigo Herbert Lucas, que me ajudou com fundamentos básicos no tema envolvido e pela disposição que teve em sanar minhas dúvidas.

“[...] Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,

mas lutei para que o melhor fosse feito [...].

Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King Jr.)

RESUMO

O *Humulus lupulus* L. planta conhecida como lúpulo é uma planta trepadeira, pertencente a família das Canabinaceas, cultivadas geralmente a partir de rizomas, é um dos ingredientes mais importantes na produção e elaboração das cervejas, nos processos em microcervejarias e indústrias cervejeiras, pois são responsáveis por darem amargor, além de ter seu efeito conservante nas formulações, essas propriedades eram descritas desde a idade média. Os ácidos amargos, principalmente os α-ácidos são um dos principais componentes e se encontram nos estróbilos ou "cone", produzidas pelas glândulas lupulínicas. Além disso autores relatam propriedades terapêuticas e diversas pesquisas tem sido realizadas com seus componentes químicos demonstrando grande interesse farmacêutico. A análise do teor de ácidos amargos do lúpulo tem grande importância para a produção da cerveja, a fim de manter um padrão de qualidade ou até mesmo planejar uma nova fermentação. Os alfa-ácidos por reação química se isomerizam a iso-alfa-ácidos, compostos responsáveis por contribuírem com o amargor das formulações. Métodos quantitativos são utilizados com a finalidade de quantificar precisamente a concentração desses compostos, das quais existem diferenças pelo tipo de produto derivado do lúpulo, como pellets, extratos CO_2 e até mesmo a análise na cerveja o produto final, os métodos mais utilizados são por espectrofotometria ou por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e são todos descritos e validados pela *American Society Brewing Chemists* (ASBC) e pela *European Brewery Convention* (EBC). O objetivo deste trabalho foi realizar a determinação dos ácidos amargos em pellets, pelo método espectrofotométrico Hops-6 (ASBC). As amostras de lúpulo, em sua forma de pellets, foram obtidas de um único distribuidor de insumos para microcervejarias. Ao realizar o experimento, foi observado que a quantidade analisada de α-ácidos foi menor em relação ao teor declarado pelo fornecedor, indicando a perda desses compostos durante o armazenamento, como descrito na literatura e artigos por oxidação, consequentemente com a perda desses compostos o potencial de amargor ou força de amargor do lúpulo expressa em *International Bitterness Units* (IBU) é diminuída, foram utilizados parâmetros do processo da produção da cerveja e a fórmula descrita em literatura para o cálculo do IBU, assim como a tabela de *Utilization* de Glenn Tinseth. Através da quantificação dos α-ácidos, é possível se calcular o potencial de amargor ou força de amargor do lúpulo a fim de se manter uma padronização na formulação ou até mesmo ser planejada uma nova fermentação.

Palavra-chave: *Humulus lupulus* L.; hops; alfa-ácidos; ácidos amargos; spectrophotometry

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAU	Alpha Acids Units
ASBC	American Society Brewing Chemists
EBC	European Brewery Convention
EMEA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
IBU	International Bitterness Units
HMPC	Committe on Herbal Medical Products
HPLC	High performance liquid chromatography
OG	Original Gravity (Gravidade Original)
oz	onças
RIAA	*Rho* Iso-Alpha Acids
SNC	Sistema Nervoso Central
U	utilization
US gal	galões americanos
V	volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 8
2 OBJETIVOS 18
2.1 Objetivos gerais 18
2.2 Objetivos específicos 18
3 MATERIAIS E MÉTODOS 19
3.1 Materiais 19
3.2 Reagentes 19
3.3 Métodos para determinação de α-ácidos e β-ácidos no lúpulo 19
3.3.1 Método 20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 22
5 CONCLUSÃO 30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 31
APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO 34

1 INTRODUÇÃO

O *Humulus lupulus* L. é conhecido como “lúpulo trepador” é uma planta trepadeira, pertencente a família das Canabinaceas, que é cultivada em regiões temperadas e úmidas da Europa, Ásia e América do Norte (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

As partes utilizadas são da inflorescência feminina, conhecidas como cone ou estrólibo e o lupulino encontradas nas glândulas das brácteas (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

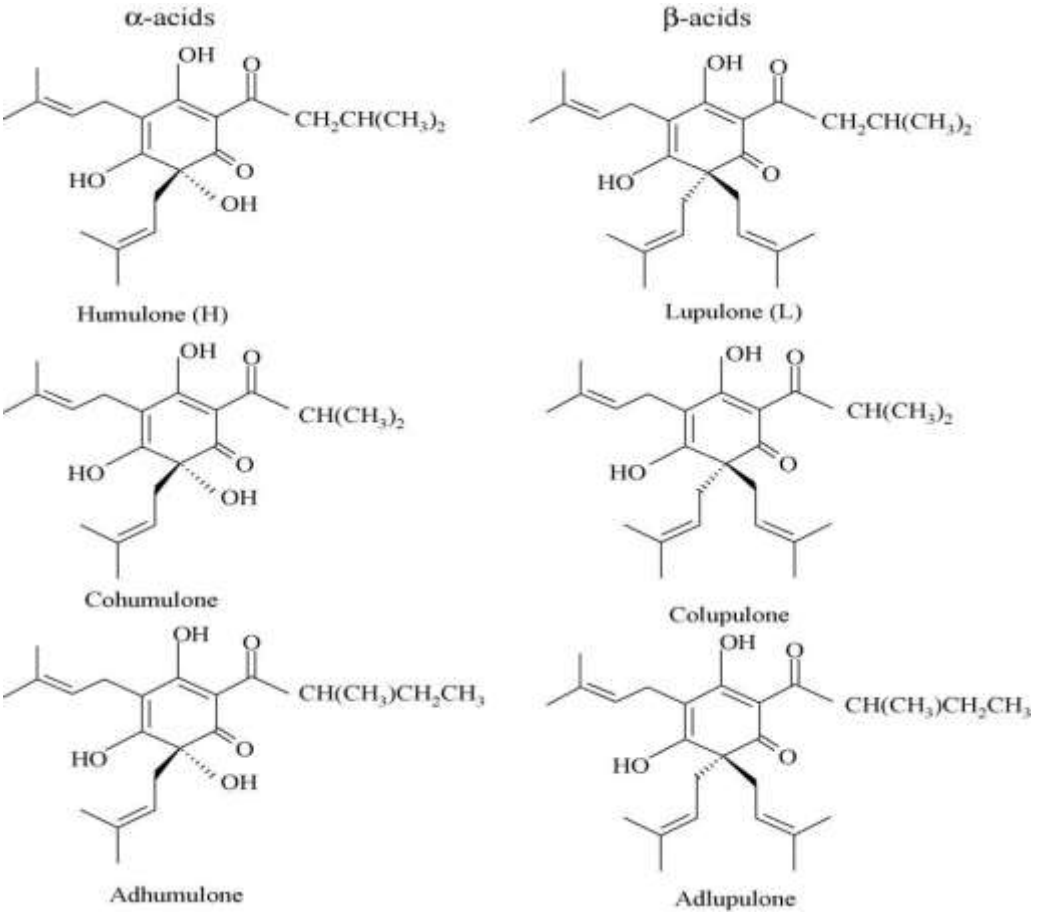
O lúpulo é muito utilizado nas indústrias cervejeiras, pois é responsável por dar amargor e aromas característicos às cervejas (TANIGUCHI *et al.*, 2014).

Jaskula-Goiris (2010), preconiza que os lúpulos, são essenciais como matéria prima na produção de cerveja. Os cones de lúpulo são constituídos de resinas, e nessas resinas são encontradas principalmente os ácidos amargos, óleos essenciais e polifenóis, todos são de interesse para a cervejaria.

Christensen (2005, p. 3) afirma, “a amargura na cerveja é largamente determinada pelos alfa-ácidos, que são componentes resinosos do lúpulo.”

As *humulonas* ou α-ácidos e *lupulonas* ou β-ácidos são a mais importante classe de compostos do lúpulo (Figura 1).

Figura 1 – Estruturas dos *α-ácidos e β-ácidos.*

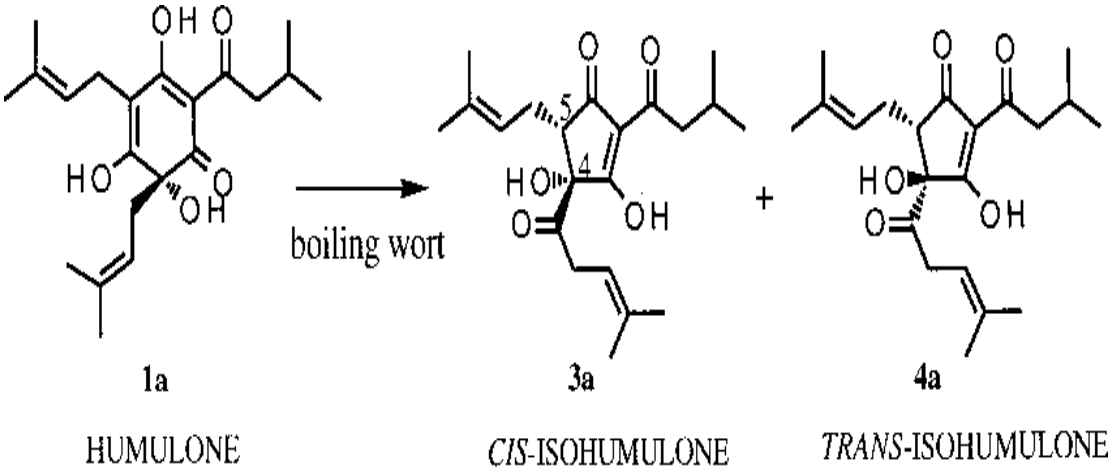


Fonte: *Zanoli & Zavatti (2008).*

Segundo De Keukeleire (2000), as transformações químicas das *humulonas* durante a fervura do mosto têm sido estudadas em grande detalhe. As *humulonas* através de uma conversão química durante a fabricação da cerveja, especificamente durante a fervura é isomerizada para a *iso-alfa-ácidos* ou *isohumulonas* (Figura 2). O mesmo fenômeno de isomerização ocorre para os demais compostos *cohumulona* e *adhumulona*, resultando em 6 isômeros (*cis-iso-humulonas, trans-iso-humulonas, cis-iso-cohumulona, cis-iso-adhumulona* e *trans-iso-adhumulona*), tornando-se solúveis.

Durante a fervura do mosto ocorre o fenômeno de isomerização, os alfa-ácidos do lúpulo se isomerizam dando origem aos iso-alfa-ácidos, que são responsáveis por caracterizar o sabor amargo na cerveja (CHRISTENSEN; LADEFOGED; NØRGAARD, 2005).

Figura 2 – Conversão das *humulonas* para *isohumulonas.*



Fonte: De Keukeleire (2000).

Segundo De Keukeleire (2000), os ácidos amargos do lúpulo têm atividade bacteriostática; eles inibem fortemente o crescimento de bactérias Gram-positivas. Esta ação está relacionada ao grupo prenil na molécula, característica das cadeias laterais dos ácidos amargos do lúpulo, com ação na membrana plasmática da célula, nos β-ácidos essa ação bacteriostática é maior. O mesmo autor relata, que diferentes aplicações têm sido exploradas em relação à atividade bacteriostática dos β-ácidos. Um uso altamente interessante é na indústria do açúcar para controlar e reduzir a atividade bacteriana durante a extração de açúcar de beterraba.

Os β-ácidos não se isomerizam durante a fervura do mosto para compostos mais solúveis (EßLINGER, 2009).

> Embora há pensamentos que a fabricação de cerveja foi realizada primeiramente na Babilônia cerca de 7000 a.C., lúpulos certamente não foram utilizadas nas preparações. Algumas evidências sugerem que os lúpulos foram cultivados na Europa Central aproximadamente 1000 d.C., mas isto não estava claro se foram usados na cerveja ou meramente para inclusão em medicamentos antigos e remédios a base de plantas. Os lúpulos provavelmente foram cultivados para cervejaria na Alemanha e República Tcheca aproximadamente algum tempo depois de 1000 e 1200 d.C. Sua horticultura e uso depois se espalhou gradualmente em toda a Europa, chegando a ser importado para a Inglaterra durante o século 14. A famosa *Reinheitsgebot*, lei de pureza de 1516 foi decretada pelo Duque da Baviera, nela a cerveja poderia ser

> fabricada usando apenas cevada (malte), lúpulo e água. Da Europa, se espalhou rapidamente através de colonos europeus para os Estados Unidos e África do Sul (século 17), Austrália e Nova Zelândia (início do século 19) e também durante os anos 1800 e 1900 em vários outros países (PRIEST & STEWART, 2006, p. 181).

Outros autores como Hieronymus (2012), descrevem que existem indícios de provas escritas que confirma que o lúpulo era bem conhecido no século VIII e cultivado em jardins de mosteiros. Em 822 dC o Abade Adalhard de Corbie emitiu estatutos que indicam que os lúpulos eram utilizados no mosteiro para a fabricação de cerveja, porém não indicavam em que momento o lúpulo tenha sido adicionado.

Hieronymus (2012), descreve que a abadessa Hildegard de St. Rupertsberg confirmou o uso do lúpulo fervido juntamente com o mosto e apreciado o seu valor conservante. Em *Physica,* tratado médico medieval da época (cerca de 1150-1160), ela escreveu: "Se desejas fazer uma cerveja de grãos e lúpulo, ferva-a também com a adição de várias folhas, como tal, uma cerveja limpa o estômago do bebedor e alivia o peito". Além disso, "a sua amargura, porém, quando adicionado às bebidas, impede a putrefação e dá-lhes uma maior durabilidade”.

O lúpulo pertence a família das Canabinaceas, são trepadeiras resistentes e no cultivo somente os lúpulos fêmeas infertilizadas desenvolvem flores, conhecidas como cones (EßLINGER, 2009).

Segundo Eßlinger (2009), o mesmo descreve que o lúpulo geralmente é cultivado a partir de rizomas e necessitam de bastante água no início e solo fertilizado com nutrientes necessários para seu desenvolvimento na fase de crescimento. Durante o crescimento dos brotos, os lúpulos são treinados em uma corda, no sentido horário em direção ao hemisfério norte, consequentemente eles se unem a corda. O lúpulo pode atingir de 5,5 m a 8 m de altura, sua taxa média de crescimento diário é de 10 cm. As flores de lúpulo se desenvolvem a partir das flores não fertilizadas.

> Os lúpulos crescem melhor entre as latitudes de 30 ° e 52 °. Preferencialmente eles devem ter 15 horas de luz ao dia, 120 dias sem geada durante a estação de crescimento e de seis a oito semanas de tempo dormente com a temperatura abaixo de 40 ° F (4,4 ° C). Eles podem ser cultivados fora desta zona, particularmente em pequena escala, mas os rendimentos em geral serão menores (HIERONYMUS, 2012, p. 89).

Quando os lúpulos começam a crescer, eles devem ser treinados em torno de uma corda, eles se desenvolvem no sentido horário em torno da corda, momento em que se deve adicionar nutrientes como nitrogênio e cálcio (HIERONYMUS, 2012).

Segundo Eßlinger (2009), o lúpulo precisa de uma grande quantidade de calor durante o crescimento, florescimento e desenvolvimento dos cones. A fertilização tem a função de manter e aumentar a fertilidade do solo de modo que as plantas de lúpulo tenham todos os nutrientes necessários disponíveis no momento certo, na forma e quantidade certa para poder absorvê-los. Além disso, devem abranger também os oligoelementos (zinco, boro, etc.). Na secagem das flores ou “cones” deve se tomar cuidado para evitar a perda de resinas amargas e aroma, sua temperatura máxima de secagem é entre 62 e 65 ° C.

Fornecedores qualificados possuem informações e as descrições detalhadas sobre variedades de lúpulos, como a concentração das resinas amargas, composição dos óleos essenciais, características sensoriais e a concentração de polifenóis (EßLINGER, 2009).

Um parâmetro importante utilizado até hoje em cervejarias, para cada estilo de cerveja é a avaliação do amargor da cerveja. O valor do amargor é expresso em uma escala como *International Bitterness Units* (IBU). O cálculo da unidade de amargor (IBU) é utilizado para avaliar e ajustar o amargor em cervejas, expressando os seus resultados em IBU. O valor de IBU tem relação com os alfa-ácidos isomerizados (iso-alfa-ácidos) e a quantidade de lúpulo adicionado no processo de fabricação da cerveja e outros fatores como gravidade do mosto e tempo de fervura e pode ser influenciado por outras variáveis (HIERONYMUS, 2012).

Segundo Sahlstrom & Rostad (2011), os alfa-ácidos têm importância sobre o sabor da cerveja e para os fabricantes de cerveja, considerando essa importância e o seu impacto significativo, esses compostos podem ser quantificados e serem medidos com precisão a sua concentração, a fim de manter padrões para uma marca conhecida ou para planejar uma nova fermentação.

Maria *et al*. (2009, p. 50), afirma “a determinação de ácidos amargos dos cones de lúpulo, pellets e extratos de lúpulo, representa um passo importante no processo de fermentação, porque dependendo do teor de ácidos amargos do lúpulo a dosagem desses compostos amargos é feita”.

Os lúpulos são considerados primariamente como um ingrediente de sabor da cerveja e com benefícios adicionais por terem efeitos antimicrobianos; as suas

pesquisas são voltadas para o uso como um agente de amargor, aroma e como agente conservante (SCHÖNBERGER & KOSTELECKY, 2011).

Segundo Almaguer *et al.* (2014), além do lúpulo ser utilizado como ingrediente de amargor, colaboram com aromas derivados dos óleos essenciais do lúpulo, e devido as suas características são descritos como frutado, floral, cítrico, gramínea e picante, os mesmos são importantes pois acrescentam aroma e ajudam a traçar o perfil de muitos estilos de cerveja.

O lúpulo além de ser importante para os processos na fabricação da cerveja, possui propriedades medicinais descritas na Idade Média e até hoje vem sendo utilizado na fitoterapia.

> No início da Idade Média, o lúpulo era caracterizado principalmente como diurético, depurador do sangue e estimulante da menstruação. O médico árabe Mesue, já no século VIII, exaltava o xarope de lúpulo como um bom remédio para a febre biliosa e para a depuração do sangue. Paracelso também prescrevia o lúpulo nos casos de distúrbios digestórios. Hufeland o apreciava como substância amarga (amarum) e remédio para o sistema nervoso. Apenas através de Hecker é que houve a descoberta da utilização terapêutica das escamas ovulíferas, às quais ele atribui o efeito tônico das substâncias amargas. O mesmo autor descreve também sua ação como tranquilizante sobre o sistema nervoso, sem, no entanto, apresentar um efeito verdadeiramente narcótico (FINTELMANN & WEISS, 2010, p. 294).

Segundo Fintelmann & Weiss (2010), a parte utilizada da planta em especial são os estróbilos e as glândulas localizadas nas suas escamas, com o efeito sedativo e indutor do sono, as quais se destacam do estróbilo de lúpulo recentemente secos com o auxílio de peneiras, esses são componentes ativos da planta e liberam substâncias medicamentosas.

Segundo Zanoli & Zavatti (2008), o uso do lúpulo na Alemanha é relatada pelo "*Committe on Herbal Medical Products*" (HMPC) da Agência Européia de Medicina (EMEA), para o tratamento de stress mental e insônia. A Comissão Alemã (*The German Comission*) aprovou o lúpulo para o tratamento de distúrbios do humor e distúrbios do sono.

Atualmente artigos científicos relatam testes e atividades neurofarmacológicas observadas em animais utilizando o extrato de *Humulus lupulus* L. e frações

contendo alfa-ácidos e beta-ácidos, além de outros compostos, mostrando assim que a planta tem um grande potencial terapêutico e sendo considerado uma planta medicinal valiosa (ZANOLI & ZAVATTI, 2008).

Recentemente foi investigado a atividade neurofarmacológica do *Humulus lupulus* L. utilizando um extrato de CO_2 de lúpulo. As frações continham α-ácidos e β-ácidos (ZANOLI & ZAVATTI, 2008).

Ambas as frações contendo α-ácidos e β-ácidos foram capazes de prolongar o tempo de sono induzido por cetamina, mas a fração contendo β-ácidos, foi necessário uma dosagem de aproximadamente 6 vezes mais elevada (200 mg / kg) do que de α-ácidos (25 mg / kg) a fim de potencializar significativamente o evento narcótico (ZANOLI & ZAVATTI, 2008).

Estudos eletrofisiológicos realizados em células granulares do cerebelo em cultura mostrou que a fracção de β-ácidos diminuiu a atividade GABAérgica de uma forma dependente da dose. Em conclusão, a fração de β-ácidos pode ser considerado como o constituinte principal responsável pelo efeito sedativo melhorado e para o estabelecimento antidepressivo observado após a administração de extrato de lúpulo CO_2 (ZANOLI & ZAVATTI, 2008).

Apesar destes estudos recentes, a identidade do princípio ativo sedativo do lúpulo bem como os mecanismos de ação ainda é questionável (ZANOLI & ZAVATTI, 2008).

Um dos artigos mais atuais teve o objetivo de analisar o efeito sedativo do lúpulo de uma cerveja sem álcool e o ritmo de sono em uma população estressada pelo trabalho.

Segundo Franco *et al.* (2012), o lúpulo, um componente da cerveja, é uma planta cuja atividade farmacológica é principalmente devido às suas resinas amargas, em particular para o ácido 2-metil-3-buten-2-ol, um produto de degradação. O mecanismo de ação da resina do lúpulo consistiria em elevar os níveis do neurotransmissor (GABA), um neurotransmissor inibidor que atua no sistema nervoso central (SNC). Na conclusão do seu trabalho foi relatado que os componentes do lúpulo de cerveja não alcoólica favorecem o descanso noturno, devido, em particular, a sua composição.

O lúpulo contém um composto além dos alfa-ácidos e beta-ácidos que chama muita atenção por conter propriedades medicinais, farmacêuticas e atividades biológicas, segundo um artigo de revisão de SREČEC *et al.*, lúpulos secos contém

1% de xanthohumol, que se encontra nas glândulas de lupulina em conjunto com alfa-ácidos e beta-ácidos e óleos essenciais, esses flavonóides são conhecidos por terem efeitos antialérgicos, antiinflamatórios, antivirais, antifúngicos, antibacteriana, antioxidante e efeitos antiproliferativos confirmados *in vitro* (SREČEC *et al*., 2011).

Segundo Srečec *et al.* (2011), diversos estudos e artigos científicos foram publicados, os componentes bioativos do lúpulo vem sendo estudados e alguns resultaram em patentes.

1.1 INIBIÇÃO DA ENZIMA CICLO-OXIGINASE (COX-2)

Um dos efeitos farmacológicos estudados e patenteado, afirma que o extrato de lúpulo, tem propriedades de antiinflamatórias, inibindo potencialmente e seletivamente a enzima *ciclo-oxigenase* (COX-2), nessa patente Eric H. Kuhrts, publicou o estudo comparativo dos efeitos do extrato CO2 de lúpulo com outros antiinflamatórios, relatando que o extrato de lúpulo possui um maior potencial antiinflamatório que o ibuprofeno.

Na patente é relatada que as composições são particularmente benéficas para o tratamento de osteoartrite e artrite reumatoide, o mesmo relata que pode ser usado para a dor crônica com efeitos gástricos colaterais gástricos reduzidos, visto que os inibidores seletivos da COX-1 inibem potencialmente as prostaglandinas e possuem efeitos colaterais indesejados, como a irritação gástrica.

1.2 EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DE EXTRATOS MODIFICADOS DE LÚPULO *IN VITRO*

Um artigo publicado em 2009 pelo *Journal of Inflammation*, menciona que o extrato modificado *Rho iso-alpha-acids* (RIAA) a partir do lúpulo, têm propriedades anti-inflamatórias *in vitro*.

Segundo Konda *et al.* (2009), foram utilizados culturas de células e marcadores inflamatórios *in vitro*, para compreender os mecanismos.

O artigo também menciona o teste em ratos com artrite. O extrato RIAA é um extrato modificado a partir do lúpulo, utilizado como agente aromatizante e de amargor em indústria cervejeira e pesquisas sugerem que tem um potencial antiinflamatório (KONDA e*t al.*, 2009).

Segundo KONDA *et al.* (2009), os extratos modificados RIAA melhoraram lesões articulares como que foram evidenciados pela redução significativa do índice de artrite e avaliação histológica; como relatado 250 mg / kg do extrato de lúpulo, em uma análise comparativa teve eficácia semelhante à de 20 mg / kg do Celecoxib.

1.3 INIBIÇÃO DE ENZIMAS DIGESTIVAS

Um artigo publicado em 2014 pela Revista Brasileira de Biociências, com estudos de extratos a partir de pellets, e menciona o potencial do extrato inibir enzimas da digestão e absorção de nutrientes. Supondo um possível para tratamento da obesidade, uma das alternativas promissoras para o tratamento da obesidade. O extrato aquoso do lúpulo apresentaria um potencial como adjuvante no tratamento da obesidade, uma vez que inibe as enzimas α-amilase e α-glicosidase (MARQUES *et al.*, 2014).

1.4 XANTHOHUMOL

Diversos artigos publicados, relatam o estudo do composto xanthohumol *in vitro*, evidenciando propriedades antiproliferativas em cultura de células, sugerindo estudos mais aprofundados, esse composto se revela de grande importância.

Segundo Sławinska-Brych *et. al*. (2015), o xanthohumol é uma chalcona prenilada, um representante dos flavonóides, um grupo de metabólitos secundários de plantas, que é naturalmente distribuída na planta *Humulus lupulus* L. (*Cannabaceae*) como um componente principal das inflorescências fêmea e até 1% em cones de lúpulo seco. Recentemente, um crescente número de artigos demonstraram um amplo espectro para o tratamento de diversas patologias relacionadas ao câncer e atividades quimiopreventivas, tais como a inibição da ativação metabólica dos pró-carcinógenos, indução de enzimas desintoxicantes carcinogênicas, e a inibição do crescimento tumoral *in vitro*. No artigo os pesquisadores citam o potencial de inibir o crescimento e proliferação das células cancerosas da mama humana (MCF-7), do cólon (HT- 29), ovário (A2780), e próstata (DU145, PC-3), bem como, o carcinoma hepatocelular e células do cancro medular da tireoide *in vitro.*

1.5 MEDICAMENTO

Atualmente um medicamento conhecido disponível no mercado no Brasil é o Remilev® da indústria Aché, laboratório nacional, que traz a combinação de extratos de *Valeriana officinalis L*. e *Humulus lupulus* L., para distúrbios do sono, tensão emocional e irritabilidade (ACHÉ, 2015).

1.6 CONTROLE DE CONTAMINANTES NA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

Os extratos de lúpulos possuem atividades propriedades antimicrobianas, são utilizados na fermentação alcóolica, a fim de controlar e reduzir a contaminação de microorganismos que impactam no rendimento da produção do etanol (PRADO & VENTURINI FILHO, 2014).

Segundo Oliva-Neto & Yokoya (2001), a contaminação microbiana compromete o processo fermentativo, podendo ocorrer o consumo de açúcar pelas bactérias e devido às toxinas e ácidos orgânicos excretados no meio, impactando na viabilidade das leveduras, consequentemente pode ocorrer à redução no rendimento e na produtividade da fermentação.

Segundo Prado & Venturini Filho (2014), seus resultados demonstram que os antimicrobianos à base de lúpulo têm eficiência igual ou superior aos antibióticos convencionais (Kamoran®, Alcapen® e Corstan®), pois não houve diferença estatística entre os tratamentos no processo fermentativo que os mesmos submeteram ao experimento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliação de amostras de pellets de *Humulus lupulus* L., quanto à concentração de alfa e beta-ácidos de diferentes variedades.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliação do potencial de amargor de pellets de *Humulus lupulus* L. em relação à concentração de alfa-ácidos das amostras de diferentes variedades.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

5 amostras de lúpulo em pellets de diferentes variedades
Béquer
Balão volumétrico
Tubos de ensaio com tampa
Gral de vidro com pistilo
Balança analítica
Pipeta volumétrica de 5 mL
Pipetas graduadas (100 µL, 200 µL, 250 µL, 1 mL)
Centrífuga
Microtubos de plástico graduados de 2 mL (Eppendorf)
Cubetas para Espectrofotômetro 1 cm
Espectrofotômetro UV-Vis da marca Shimadzu modelo UV-1203

3.2 REAGENTES

Hidróxido de Sódio 6N
Metanol
Tolueno

3.3 MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE α-ÁCIDOS E β-ÁCIDOS NO LÚPULO

Segundo Priest & Stewart (2006), para se quantificar os α-ácidos e β-ácidos, são utilizados os métodos por Espectrofotometria UV-Vis e HPLC, através desses métodos é possível quantificar os compostos presentes no lúpulo, sendo o HPLC o mais recomendado e utilizado atualmente, mas através da Espectrofotometria é possível quantificar os principais compostos utilizados no lúpulo como os α-ácidos e β-ácidos, importantes para os processos em cervejarias.

Esse método é validado pela *American Society of Brewing Chemists* (ASBC) e foi lançado em 2010, onde o lúpulo é extraído com tolueno, é centrifugado para a separação dos resíduos do lúpulo e diluído em metanol alcalino, onde é medido

através de três comprimentos de onda diferentes. Para a análise espectrofotométrica de lúpulos em pellets utiliza-se o método da *American Society of Brewing Chemists* (ASBC) – Hops-6. É possível fazer análise pelos métodos por HPLC entre eles estão o método Hops-8, abrangendo de análises de pellets até a análise de extratos não-isomerizados, Hops-15 para análise de pellets isomerizados e Hops-16 para a análise de extratos não-isomerizados e extratos isomerizados (HOPSTEINER, 2011).

O padrão utilizado e citado no método é o ICE-2 um padrão de extrato CO_2, com concentrações específicas para calibração, porém esse padrão foi substituído pelo padrão ICE-3 e geralmente se utiliza o método por HPLC, a descrição dos métodos podem ser encontrados para venda juntamente com o padrão. Segundo alguns fornecedores desses padrões como a Labor Veritas AG, descrevem que não há diferenças significativas, com o novo padrão pode ter uma queda relativa de 5%, isto é, o novo padrão dá um resultado inferior. No entanto o comitê concordou que o uso do padrão ICE-3 irá conduzir a um resultado mais exato.

3.3.1 MÉTODO

As amostras de diferentes variedades de *Humulus lupulus* L. foram compradas de um único distribuidor que comercializa insumos para microcervejarias, foram utilizadas para o método de análise a sua forma em pellets.

Para realizar o preparo da amostra triturou-se uma pequena quantidade de lúpulo em pellets de cada variedade em um gral de vidro com pistilo e pesou-se 4 amostras de cada variedade com 250 mg em balança analítica. Transferiu-se quantitativamente para os tubos de ensaio com tampa, as amostras foram mantidas sob agitação de 30 minutos em solução com 5 mL de tolueno, após pipetou-se 1,5 mL para os microtubos de plástico graduados de 2 mL (Eppendorf). Em seguida centrifugou-se as amostras a 3000 rpm por 10 minutos, para separação dos resíduos. Após essa etapa pipetou-se 250 µL da solução de lúpulo para tubos de ensaio contendo 4,75 mL de metanol, totalizando a solução com 5 mL (Diluição A).

Para aplicação das etapas posteriores da leitura pelo método de Espectrofotometria UV-Vis, pipetou-se 200 µL de NaOH 6,0 N para 100 mL de metanol, para o preparo da solução de metanol alcalino e reservado a solução.

Para realizar o preparo do branco pipetou-se 250 µL de tolueno com 4,75 mL de metanol (Diluição A).

Para a calibração do branco para as amostras pipetou-se 200 µL do branco preparado anteriormente com 4 mL de metanol alcalino, em seguida agitou-se e zerou-se o equipamento (Diluição B).

Para realizar a leitura da amostra pipetou-se 200 µL da solução de lúpulo com metanol para 4 mL de metanol alcalino (diluição B), em seguida agitou-se manualmente e foram transferidas para as cubetas de espectrofotômetro que foram submetidas a leitura em comprimentos de onda de 275 nm, 325 nm, 355 nm.

Através das equações abaixo é possível realizar a quantificação dos α-ácidos e β-ácidos. O “d” é o fator de diluição (PRIEST & STEWART, 2006).

$$\% \text{ alfa ácidos} = d \times (-51.56\ A355 + 73.79\ A325 - 19.07\ A275)$$

$$\% \text{ beta ácidos} = d \times (55.57\ A355 - 47.59\ A325 + 5.10\ A275)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a *American Society of Brewing Chemists* (ASBC), uma das principais funções do lúpulo na fabricação de cerveja é fornecer parte dos componentes que caracterizam o amargor da cerveja. Os α-ácidos são os precursores primários de substâncias que dão características de amargor a cerveja e, como tal, a sua avaliação é necessária e se torna um procedimento analítico importante. Durante o experimento foram submetidos à análise 5 variedades de lúpulo e foram obtidos os seguintes resultados:

POLARIS
Teor de alfa-ácidos declarado: 16,5%
Lote: 0113
Data Fab: 12/2014
Validade: 12/2017
Tempo de Armazenamento: 17 meses

Tabela 1 – Resultado da análise do lúpulo Polaris por espectrofotometria pelo método da ASBC

Variedade		***Comprimentos de onda***	***Absorbâncias***	***Teor de α e β-ácidos***	
				Individuais	**Média**
Polaris	Amostra 1	λ 275 λ 325 λ 355	0,420 0,928 0,836	α 14,58 % β 3,72 %	**α 14,73 % β 3,56 %**
	Amostra 2	λ 275 λ 325 λ 355	0,359 0,867 0,785	α 14,00 % β 3,52 %	
	Amostra 3	λ 275 λ 325 λ 355	0,389 0,928 0,833	α 15,21 % β 3,45 %	
	Amostra 4	λ 275 λ 325 λ 355	0,386 0,929 0,837	α 15,14 % β 3,58 %	

HALLERTAUER MAGNUM
Teor de alfa-ácidos declarado: 12,6%
Lote: 2621
Data Fab: 05/2014
Validade: 05/2017
Tempo de Armazenamento: 24 meses

Tabela 2 – Resultado da análise do lúpulo Hallertauer Magnum por espectrofotometria pelo método da ASBC

Variedade		***Comprimentos de onda***	***Absorbâncias***	***Teor de α e β-ácidos***	
				Individuais	**Média**
Magnum	Amostra 1	λ 275	0,292	α 9,04 %	**α 8,89 %**
		λ 325	0,700	β 5,24 %	**β 5,14 %**
		λ 355	0,685		
	Amostra 2	λ 275	0,283	α 8,97 %	
		λ 325	0,693	β 5,25 %	
		λ 355	0,680		
	Amostra 3	λ 275	0,251	α 8,73 %	
		λ 325	0,653	β 4,84 %	
		λ 355	0,640		
	Amostra 4	λ 275	0,280	α 8,82 %	
		λ 325	0,685	β 5,23 %	
		λ 355	0,673		

ADMIRAL
Teor de alfa-ácidos declarado: 16,1%
Lote: 13-427
Data Fab: 11/2014
Validade: 11/2017
Tempo de Armazenamento: 18 meses

Tabela 3 – Resultado da análise do lúpulo Admiral por espectrofotometria pelo método da ASBC

Variedade		***Comprimentos de onda***	***Absorbâncias***	***Teor de α e β-ácidos***	
				Individuais	**Média**
Admiral	Amostra 1	λ 275	0,343	α 10,61 %	**α 10,90 %**
		λ 325	0,798	β 5,51 %	**β 5,26 %**
		λ 355	0,770		
	Amostra 2	λ 275	0,344	α 10,66 %	
		λ 325	0,792	β 5,28 %	
		λ 355	0,760		
	Amostra 3	λ 275	0,368	α 11,09 %	
		λ 325	0,808	β 4,93 %	
		λ 355	0,764		
	Amostra 4	λ 275	0,389	α 11,25 %	
		λ 325	0,839	β 5,32 %	
		λ 355	0,797		

HALLERTAUER PERLE
Teor de alfa-ácidos declarado: 5,7%
Lote: 2613
Data Fab: 05/2014
Validade: 05/2017
Tempo de Armazenamento: 24 meses

Tabela 4 – Resultado da análise do lúpulo Hallertauer Perle por espectrofotometria pelo método da ASBC

Variedade		***Comprimentos de onda***	***Absorbâncias***	***Teor de α e β-ácidos***	
				Individuais	**Média**
Perle	Amostra 1	λ 275	0,110	α 5,15 %	**α 3,46 %** **β 3,73 %**
		λ 325	0,412	β 4,07 %	
		λ 355	0,430		
	Amostra 2	λ 275	0,171	α 2,71 %	
		λ 325	0,327	β 3,62 %	
		λ 355	0,342		
	Amostra 3	λ 275	0,130	α 3,34 %	
		λ 325	0,316	β 3,18 %	
		λ 355	0,327		
	Amostra 4	λ 275	0,138	α 2,64 %	
		λ 325	0,325	β 4,07 %	
		λ 355	0,353		

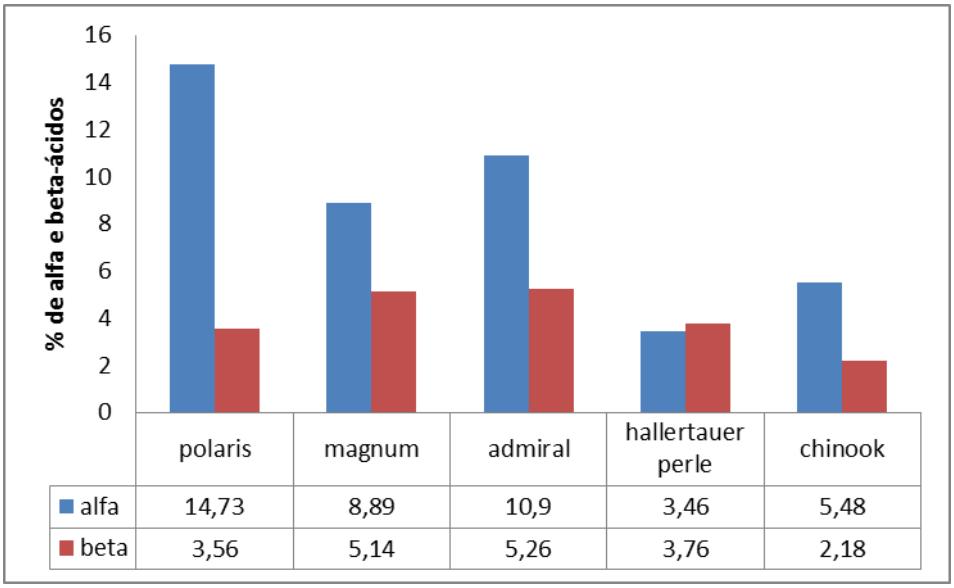
CHINOOK
Teor de alfa-ácidos declarado: 11,4%
Lote: P-15-14-S
Data Fab: 02/2015
Validade: 02/2018
Tempo de Armazenamento: 18 meses

Tabela 5 – Resultado da análise do lúpulo Chinook por espectrofotometria pelo método da ASBC

Variedade		***Comprimentos de onda***	***Absorbâncias***	***Teor de α e β-ácidos***	
				Individuais	**Média**
Chinook	Amostra 1	λ 275 λ 325 λ 355	0,442 0,511 0,440	α 5,53 % β 2,00 %	**α 5,48 %** **β 2,18 %**
	Amostra 2	λ 275 λ 325 λ 355	0,416 0,509 0,449	α 5,43 % β 2,39 %	
	Amostra 3	λ 275 λ 325 λ 355	0,408 0,481 0,418	α 5,17 % β 2,03 %	
	Amostra 4	λ 275 λ 325 λ 355	0,370 0,498 0,442	α 5,79 % β 2,30 %	

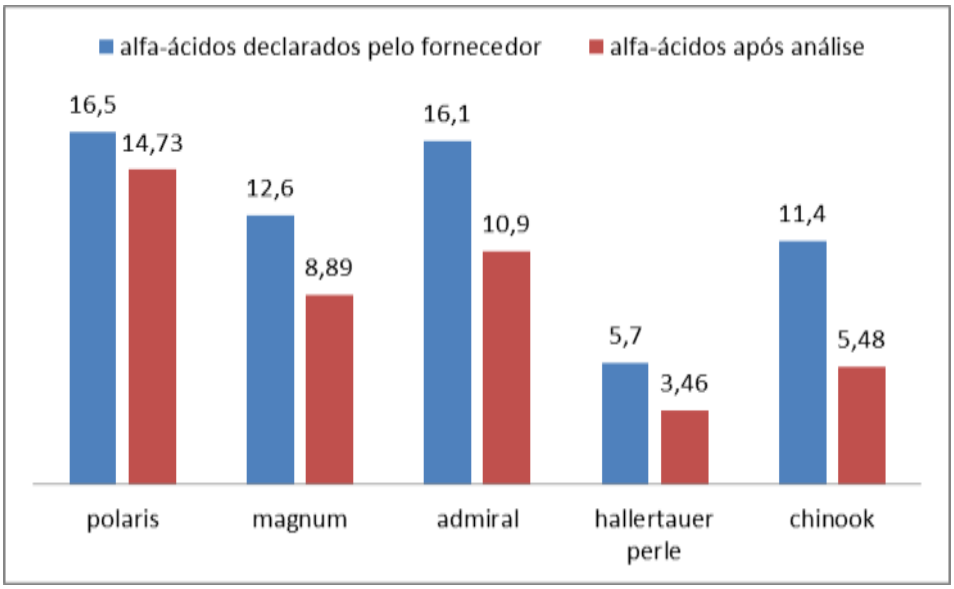
A partir das tabelas foram elaborados gráficos para melhor visualização dos resultados.

Gráfico 1 – Teor de α e β-ácidos das amostras que foram submetidas à análise



O teor de α-ácidos após análise demonstram ser menores em comparação ao teor declarado de α-ácidos na embalagem e no certificado de análise emitido pelo fornecedor, estes dados estão representados no Gráfico 2:

Gráfico 2 – Teor de α-ácidos das amostras que foram submetidas à análise em relação aos teores declarados pelo fornecedor



Como já descrito por Eßlinger (2009), os alfa-ácidos degradam-se conforme o tempo e condições de armazenamento, através da oxidação desses compostos. Isso explica a perda de α-ácidos durante o armazenamento e consequentemente o seu potencial de amargor. Segundo Verzele (1986), em um ou dois anos, a oxidação das *humulonas* e de outros α-ácidos é uma das mais importantes ocorrências químicas pelo qual o lúpulo e seus derivados deterioram-se e perdem seus conteúdos de α-ácidos, o mesmo autor classifica esses lúpulos em seu artigo como “old hops” (velhos lúpulos).

Entretanto, segundo Priest & Stewart (2006), algumas variedades são notavelmente estáveis e deterioram-se lentamente em temperatura ambiente, enquanto outras variedades que são significativamente instáveis deterioram-se mesmo em condições de armazenamento abaixo de zero, essa instabilidade é observada por perda de α e β-ácidos.

A análise espectrofotométrica do percentual de α-ácidos reais, ou seja, após análise laboratorial da concentração dos α-ácidos declarados na embalagem, é essencial para a determinação do potencial de amargor, o teor após análise pode ser inserido em uma equação, utilizando a tabela de utilização de Glenn Tinseth, que é um fator correspondente entre densidade inicial/*original gravity* (OG) em função do tempo de fervura, para a determinação do potencial de amargor (IBU).

A partir dos teores de α-ácidos, foram calculados o potencial de amargor das amostras de lúpulo utilizando a fórmula de IBU preconizada por Palmer (2006), conforme Gráfico 3, através da fórmula:

$$IBU = AAU \times U \times 75 / V$$

Sendo:

AAU = Alpha-Acids Units (Peso em onças (*oz*) x % α-ácidos)

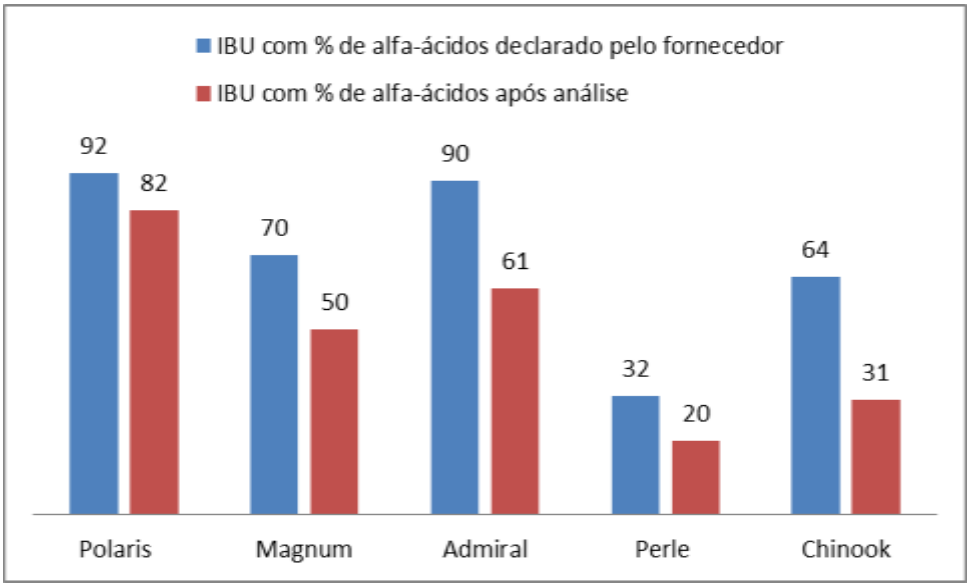
U = Utilization (Glenn Tinseth)

V = Volume da receita em *US gal (galões americanos)*

Utilizando os seguintes parâmetros:

Quantidade: 50 g equivale a 1,76 oz
Volume: 20 litros equivale 5,5 galões americanos
Densidade inicial do mosto: 1.050
Tempo de Fervura: 60 min.
Utilization (Glenn Tinseth): .231

Gráfico 3 – Potencial de amargor das amostras relacionadas a concentração de α-ácidos declarados pelo fornecedor em comparação com a análise posterior pelo método de espectrofotometria.



5 CONCLUSÃO

As amostras foram avaliadas e apresentam teores de alfa-ácidos menores que o descrito pelo fornecedor.

Ao analisar as amostras observou-se que houve aproximação dos teores individuais nos resultados obtidos em cada variedade. Os teores de alfa-ácidos encontrados são diferentes daqueles declarados pelos fornecedores, teores sempre menores, indicando degradação da amostra, conforme literatura, por oxidação.

Calculando-se o potencial de amargor ou a força de amargor do lúpulo dentro dos parâmetros descritos, é visível que com a degradação e perda do teor de α-ácidos, o IBU consequentemente é diminuído, indicando um potencial de amargor menor comparado com o potencial de amargor utilizando o teor de α-ácidos declarados pelo fornecedor. Com a determinação dos α-ácidos por análise espectrofotométrica e o cálculo prévio do IBU pode-se planejar a quantidade de lúpulo a ser empregada na preparação da cerveja para se atingir determinado amargor (IBU) a fim de se padronizar uma formulação ou planejar novas fermentações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHÉ LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS. **Bula Remilev.** Aché, 2015. Disponível em <http://www.ache.com.br/arquivos/Remilev26-03-2015.pdf > Acesso em: 10 Agosto de 2016.

ALCARDE, A.R.; HORII, J.; NOBREI, T.P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 20-25, jan./mar. 2007.

ASBC Methods of Analysis. **Hops Method 6. α-and β-Acids by Spectrophotometry.** American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, U.S.A., 2010. Disponível em: < http://methods.asbcnet.org/summaries/hops-6.aspx> Acesso em: 11 de Agosto de 2016.

ALMAGUER, Cynthia; SCHÖNBERGER, Christina; GASTL, Martina; ARENDT, Elke K.; BECKER, Thomas. *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing,** London, England, v. 120, n. 4, p. 289-314, jun./jul., 2014.

CHRISTENSEN, Jakob; LADEFOGED, Anne Marie; NØRGAARD, Lars. Rapid Determination of Bitterness in Beer Using Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics. **Journal of the Institute of Brewing,** London, England, v. 111, n. 1, p. 3-10, 2005.

CUNHA, A. Proença; SILVA, Alda Pereira; ROQUE, Odete Rodrigues. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia.** 1ª Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

DE KEUKELEIRE, Denis. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 108-112, Feb. 2000.

EßLINGER, Hans Michael. **Handbook of brewing. Processes, Technology, Markets**. 1ª Edição. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.

FINTELMANN, Volker; WEISS, Rudolf Fritz. **Manual de Fitoterapia.** 11ª. Edição. Guanabara: Koogan, 2010.

FRANCO, Lourdes; SÁNCHEZ, Cristina; BRAVO, Rafael; RODRÍGUEZ, Ana B.; BARRIGA, Carmen; ROMERO, Eulalia; CUBERO, Javier. The Sedative Effect of Non-Alcoholic Beer in Healthy Female Nurses. **Journal PLoS ONE**, Université Pierre et Marie Curie, France, v.7, n.7, p.1-6, 2012.

HIERONYMUS, Stan. **For the love of hops : the practical guide to aroma, bitterness, and the culture of hops.** 1ª Edição. Colorado: Brewers Association, 2012.

HOPSTEINER. **Analytical Methods for Hops and Hop Products.** Hopsteiner, 2011. Disponível em <http://www.hopsteiner.com/news/type/newsletters/page/5/> Acesso em: 11 de Agosto de 2016.

JASKULA-GOIRIS, Barbara; AERTS, Guido; DE COOMAN, Luc. Hop α-acids isomerisation and utilisation: an experimental review. **Elselvier B.V**, Ghent, Belgium, v. 35, n.1, p. 57-70, 2010.

KONDA, Veera Reddy; DESAI, Anuradha; DARLAND, Gary; BLAND, Jeffrey S.; TRIPP, Matthew L. *Rho* iso-alpha acids from hops inhibit the GSK-3/NF-κB pathway and reduce inflammatory markers associated with bone and cartilage degradation. **Journal of Inflammation**, London, England, v. 6, n. 26, p. 1-9, 2009.

MARIA, Tofană; MUDURA, Elena; MUSTE, Sevastiţa; SOCACI, Sonia Ancuţa; MUREŞAN, Crina. The validation of the HPLC Hop Bitter acids method. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies,** Cluj-Napoca, Romania, v. 15, n.1, p. 50-54, 2009.

MARQUES, Tamara Rezende; PEREIRA, Luciana Lopes Silva; SIMÃO, Anderson Assaid; RAMOS, Vinicius de Oliveira; BRAGA, Mariana Aparecida; CORRÊA, Angelita Duarte; SANTOS, Custodio Donizete. Inibição de enzimas digestivas por pellets de lúpulo (*Humulus lupulus* L.). **Revista Brasileira de Biociências,** São Paulo, v.12, n.4, p. 183-187, out./dez. 2014.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology,** São Paulo, v. 32, n. 1, p. 10-14, 2001.

PALMER, John J. **How to brew : ingredients, methods, recipes and equipment for brewing beer at home.** 3ª Edição. Colorado: Brewers Publications, 2006.

PRADO, Josimara Lacerda; VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni. Uso de Antibióticos Convencionais e Antimicrobianos a Base de Lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcóolica. **Revista Energia na Agricultura,** Botucatu, v. 29, n. 4, p. 277-281, outubro-dezembro, 2014.

PRIEST, Fergus G., STEWART, Graham G. **Handbook of brewing.** 2ª Edição: Flórida: Taylor & Francis Group, 2006.

SAHLSTROM, Adam; ROSTAD, Stephen. HPLC determination of α- and β-acids in hops**. Concordia College Journal of Analytical Chemistry**, Moorhead, United States, n. 2, p. 78-83, 2011.

SCHÖNBERGER, C; KOSTELECKY; T. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. **Journal of the Institute of Brewing,** London, England, v. 117, n. 3, p. 259-267, 2011.

SREČEC, Siniša; ZECHNER-KRPAN, Vesna; PETRAVIĆ-TOMINAC, Vlatka; KOŠIR, Iztok Jože; ČERENAK, Andreja. Importance of Medical Effects of Xanthohumol, Hop (*Humulus lupulus* L.) Bioflavonoid in Restructuring of World Hop Industry. **Agriculturae Conspectus Scientificus,** Zagreb, Croatia, v.77, n. 2, p. 61-67, abr./jul. 2011.

SŁAWINSKA-BRYCH, Adrianna; KROL, Sylwia Katarzyna; DMOSZYNSKA-GRANICZKA, Magdalena; ZDZISINSKA, Barbara; STEPULAK, Andrzej; GAGOS, Mariusz. Xanthohumol inhibits cell cycle progression and proliferation of larynx cancer cells in vitro, **Chemico-Biological Interactions,** Elsevier Ireland, v. 240, p. 110-118, abr./ago. 2015.

TANIGUCHI, Yoshimasa; TANIGUCHI, Harumi; YAMADA, Makiko; MATSUKURA, Yasuko; KOIZUMI, Hideki; FURIHATA, Kazuo; SHINDO, Kazutoshi. Analysis of the Components of Hard Resin in Hops (*Humulus lupulus* L.) and Structural Elucidation of Their Transformation Products Formed during the Brewing Process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Tokyo, Japan, v. 62, n. 47, p. 11602−11612, out./out. 2014.

VERZELE, M. Centenary review 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing. **Journal of the Institute of Brewing,** London, England, v. 92, n. 1, p. 32-48, jan./feb., 1986.

ZANOLI, Paola; ZAVATTI, Manuela. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology,** Elsevier Ireland, v.116, n. 3, p. 383-396, jan./jan. 2008.

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO

Avaliação de ácidos amargos de diferentes variedades de *Humulus lupulus* L.

Evaluation of bitter acids of different varieties of *Humulus lupulus* L.

FERREIRA, Maxwell Rodrigues; GARCIA-AMOEDO, Luis Henrique
Universidade Mogi das Cruzes

RESUMO: O *Humulus lupulus* L. planta conhecida como lúpulo é uma planta trepadeira, pertencente a família das Canabinaceas, é um dos ingredientes mais importantes na produção e elaboração das cervejas, nos processos em cervejarias. O objetivo deste trabalho foi realizar a determinação dos ácidos amargos, α e β-ácidos em amostras de pellets, pelo método espectrofotométrico e ao realizar o experimento, foi observado que a quantidade analisada de α-ácidos foi menor em relação ao teor declarado pelo fornecedor, indicando a perda desses compostos durante o armazenamento, como descrito na literatura e artigos por oxidação, consequentemente com a perda desses compostos o potencial de amargor ou força de amargor do lúpulo expressa em *International Bitterness Units* (IBU) é diminuída, foram utilizados parâmetros da produção da cerveja e a fórmula descrita em literatura para o cálculo do IBU, assim como a tabela de *Utilization* de Glenn Tinseth.

Palavra-chave: *Humulus lupulus* L.; lúpulo; alfa-ácidos; ácidos amargos; espectrofotometria.

Key Words: *Humulus lupulus* L.; hops; alpha-acids; bitter acids; spectrophotometry.

1 INTRODUÇÃO

O *Humulus lupulus* L. é conhecido como “lúpulo trepador” é uma planta trepadeira, pertencente a família das Canabinaceas, que é cultivada em regiões temperadas e úmidas da Europa, Ásia e América do Norte (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

As partes utilizadas são da inflorescência feminina, conhecidas como cone ou estrólibo e o lupulino encontradas nas glândulas das brácteas (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003).

O lúpulo é muito utilizado nas indústrias cervejeiras, pois é responsável por dar amargor e aromas característicos às cervejas (TANIGUCHI *et al.*, 2014).

Jaskula-Goiris (2010), preconiza que os lúpulos, são essenciais como matéria prima na produção de cerveja. Os cones de lúpulo são constituídos de resinas, e nessas resinas são encontradas principalmente os ácidos amargos, óleos essenciais e polifenóis, todos são de interesse para a cervejaria.

Christensen (2005, p. 3) afirma, “a amargura na cerveja é largamente determinada pelos alfa-ácidos, que são componentes resinosos do lúpulo.”

As *humulonas* ou α-ácidos e *lupulonas* ou β-ácidos são a mais importante classe de compostos do lúpulo.

Segundo De Keukeleire (2000), as transformações químicas das *humulonas* durante a fervura do mosto têm sido estudadas em grande detalhe. As *humulonas* através de uma conversão química durante a fabricação da cerveja, especificamente durante a fervura é isomerizada para a *iso-alfa-ácidos* ou *isohumulonas*. O mesmo fenômeno de isomerização ocorre para os demais compostos *cohumulona* e *adhumulona*, resultando em 6 isômeros (*cis-iso-humulonas, trans-iso-humulonas, cis-iso-cohumulona, cis-iso-adhumulona* e *trans-iso-adhumulona*), tornado-se solúvel.

Durante a fervura do mosto ocorre o fenômeno de isomerização, os alfa-ácidos do lúpulo se isomerizam dando origem aos iso-alfa-ácidos, que são responsáveis por caracterizar o sabor amargo na cerveja (CHRISTENSEN; LADEFOGED; NØRGAARD, 2005).

Segundo De Keukeleire (2000), os ácidos amargos do lúpulo têm atividade bacteriostática; eles inibem fortemente o crescimento de bactérias Gram-positivas. Esta ação está relacionada ao grupo prenil na molécula, característica das cadeias laterais dos ácidos amargos do lúpulo, com ação na membrana plasmática da célula, nos β-ácidos essa ação bacteriostática é maior. O mesmo autor relata, que diferentes aplicações têm sido exploradas em relação à atividade bacteriostática dos β-ácidos. Um uso altamente interessante é na indústria do açúcar para controlar e reduzir a atividade bacteriana durante a extração de açúcar de beterraba.

Os β-ácidos não se isomerizam durante a fervura do mosto para compostos mais solúveis (EßLINGER, 2009).

Embora há pensamentos que a fabricação de cerveja foi realizada primeiramente na Babilônia cerca de 7000 a.C., lúpulos certamente não foram utilizadas nas preparações. Algumas evidências sugerem que os lúpulos foram cultivados na Europa Central aproximadamente 1000 d.C., mas isto não estava claro se foram usados na cerveja ou meramente para inclusão em medicamentos antigos e remédios a base de plantas. Os lúpulos provavelmente foram cultivados para cervejaria na Alemanha e República Tcheca aproximadamente algum tempo depois de 1000 e 1200 d.C. Sua horticultura e uso depois se espalhou gradualmente em toda a Europa, chegando a ser importado para a Inglaterra durante o século 14. A famosa *Reinheitsgebot*, lei de pureza de 1516 foi decretada pelo Duque da Baviera, nela a cerveja poderia ser fabricada usando apenas cevada (malte), lúpulo e água. Da Europa, se espalhou rapidamente através de colonos europeus para os Estados

Unidos e África do Sul (século 17), Austrália e Nova Zelândia (início do século 19) e também durante os anos 1800 e 1900 em vários outros países (PRIEST & STEWART, 2006, p. 181).

Outros autores como Hieronymus (2012), descrevem que existem indícios de provas escritas que confirma que o lúpulo era bem conhecido no século VIII e cultivado em jardins de mosteiros. Em 822 dC o Abade Adalhard de Corbie emitiu estatutos que indicam que os lúpulos eram utilizados no mosteiro para a fabricação de cerveja, porém não indicavam em que momento o lúpulo tenha sido adicionado.

Hieronymus (2012), descreve que a abadessa Hildegard de St. Rupertsberg confirmou o uso do lúpulo fervido juntamente com o mosto e apreciado o seu valor conservante. Em *Physica,* tratado médico medieval da época (cerca de 1150-1160), ela escreveu: "Se desejas fazer uma cerveja de grãos e lúpulo, ferva-a também com a adição de várias folhas, como tal, uma cerveja limpa o estômago do bebedor e alivia o peito". Além disso, "a sua amargura, porém, quando adicionado às bebidas, impede a putrefação e dá-lhes uma maior durabilidade”.

O lúpulo pertence a família das Canabinaceas, são trepadeiras resistentes e no cultivo somente os lúpulos fêmeas infertilizadas desenvolvem flores, conhecidas como cones (EßLINGER, 2009).

Segundo Eßlinger (2009), o mesmo descreve que o lúpulo geralmente é cultivado a partir de rizomas e necessitam de bastante água no início e solo fertilizado com nutrientes necessários para seu desenvolvimento na fase de crescimento. Durante o crescimento dos brotos, os lúpulos são treinados em uma corda, no sentido horário em direção ao hemisfério norte, consequentemente eles se unem a corda. O lúpulo pode atingir de 5,5 m a 8 m de altura, sua taxa média de crescimento diário é de 10 cm. As flores de lúpulo se desenvolvem a partir das flores não fertilizadas.

Os lúpulos crescem melhor entre as latitudes de 30 ° e 52 °. Preferencialmente eles devem ter 15 horas de luz ao dia, 120 dias sem geada durante a estação de crescimento e de seis a oito semanas de tempo dormente com a temperatura abaixo de 40 ° F (4,4 ° C). Eles podem ser cultivados fora desta zona, particularmente em pequena escala, mas os rendimentos em geral serão menores (HIERONYMUS, 2012, p. 89).

Quando os lúpulos começam a crescer, eles devem ser treinados em torno de uma corda, eles se desenvolvem no sentido horário em torno da corda, momento em que se deve adicionar nutrientes como nitrogênio e cálcio (HIERONYMUS, 2012).

Segundo Eßlinger (2009), o lúpulo precisa de uma grande quantidade de calor durante o crescimento, florescimento e desenvolvimento dos cones. A fertilização tem a função de manter e aumentar a fertilidade do solo de modo que as plantas de lúpulo tenham todos os nutrientes necessários disponíveis no momento certo, na forma e quantidade certa para poder absorvê-los. Além disso, devem abranger também os oligoelementos (zinco, boro, etc.). Na secagem das flores ou “cones” deve se tomar cuidado para evitar a perda de resinas amargas e aroma, sua temperatura máxima de secagem é entre 62 e 65 ° C.

Fornecedores qualificados possuem informações e as descrições detalhadas sobre variedades de lúpulos, como a concentração das resinas amargas, composição dos óleos essenciais, características sensoriais e a concentração de polifenóis (EßLINGER, 2009).

Um parâmetro importante utilizado até hoje em cervejarias, para cada estilo de cerveja é a avaliação do amargor da cerveja. O valor do amargor é expresso em uma escala como *International Bitterness Units* (IBU). O cálculo da unidade de amargor (IBU) é utilizado para avaliar e ajustar o amargor em cervejas, expressando os seus resultados em IBU. O valor de IBU tem relação com os alfa-ácidos isomerizados (iso-alfa-ácidos) e a quantidade de lúpulo adicionado no processo de fabricação da cerveja e outros fatores como gravidade do mosto e tempo de fervura e pode ser influenciado por outras variáveis (HIERONYMUS, 2012).

Segundo Sahlstrom & Rostad (2011), os alfa-ácidos têm importância sobre o sabor da cerveja e para os fabricantes de cerveja, considerando essa importância e o seu impacto significativo, esses compostos podem ser quantificados e serem medidos com precisão a sua concentração, a fim de manter padrões para uma marca conhecida ou para planejar uma nova fermentação.

Maria *et al*. (2009, p. 50), afirma “a determinação de ácidos amargos dos cones de lúpulo, pellets e extratos de lúpulo, representa um passo importante no processo de fermentação, porque dependendo do teor de ácidos amargos do lúpulo a dosagem desses compostos amargos é feita”.

Os lúpulos são considerados primariamente como um ingrediente de sabor da cerveja e com benefícios adicionais por terem efeitos antimicrobianos; as suas

pesquisas são voltadas para o uso como um agente de amargor, aroma e como agente conservante (SCHÖNBERGER & KOSTELECKY, 2011).

Segundo Almaguer *et al.* (2014), além do lúpulo ser utilizado como ingrediente de amargor, colaboram com aromas derivados dos óleos essenciais do lúpulo, e devido as suas características são descritos como frutado, floral, cítrico, gramínea e picante, os mesmos são importantes pois acrescentam aroma e ajudam a traçar o perfil de muitos estilos de cerveja.

O lúpulo além de ser importante para os processos na fabricação da cerveja, possui propriedades medicinais descritas na Idade Média e até hoje vem sendo utilizado na fitoterapia.

No início da Idade Média, o lúpulo era caracterizado principalmente como diurético, depurador do sangue e estimulante da menstruação. O médico árabe Mesue, já no século VIII, exaltava o xarope de lúpulo como um bom remédio para a febre biliosa e para a depuração do sangue. Paracelso também prescrevia o lúpulo nos casos de distúrbios digestórios. Hufeland o apreciava como substância amarga (amarum) e remédio para o sistema nervoso. Apenas através de Hecker é que houve a descoberta da utilização terapêutica das escamas ovulíferas, às quais ele atribui o efeito tônico das substâncias amargas. O mesmo autor descreve também sua ação como tranquilizante sobre o sistema nervoso, sem, no entanto, apresentar um efeito verdadeiramente narcótico (FINTELMANN & WEISS, 2010, p. 294).

Segundo Fintelmann & Weiss (2010), a parte utilizada da planta em especial são os estróbilos e as glândulas localizadas nas suas escamas, com o efeito sedativo e indutor do sono, as quais se destacam do estróbilo de lúpulo recentemente secos com o auxílio de peneiras, esses são componentes ativos da planta e liberam substâncias medicamentosas.

Segundo Zanoli & Zavatti (2008), o uso do lúpulo na Alemanha é relatada pelo "*Committe on Herbal Medical Products*" (HMPC) da Agência Européia de Medicina (EMEA), para o tratamento de stress mental e insônia. A Comissão Alemã (*The German Comission*) aprovou o lúpulo para o tratamento de distúrbios do humor e distúrbios do sono.

Atualmente artigos científicos relatam testes e atividades neurofarmacológicas observadas em animais utilizando o extrato de *Humulus lupulus* L. e frações contendo alfa-ácidos e beta-ácidos, além de outros compostos, mostrando assim

que a planta tem um grande potencial terapêutico e sendo considerado uma planta medicinal valiosa (ZANOLI *&* ZAVATTI, 2008).

Recentemente foi investigado a atividade neurofarmacológica do *Humulus lupulus* L. utilizando um extrato de CO_2 de lúpulo. As frações continham α-ácidos e β-ácidos (ZANOLI *&* ZAVATTI, 2008).

Ambas as frações contendo α-ácidos e β-ácidos foram capazes de prolongar o tempo de sono induzido por cetamina, mas a fração contendo β-ácidos, foi necessário uma dosagem de aproximadamente 6 vezes mais elevada (200 mg / kg) do que de α-ácidos (25 mg / kg) a fim de potencializar significativamente o evento narcótico (ZANOLI & ZAVATTI, 2008).

Estudos eletrofisiológicos realizados em células granulares do cerebelo em cultura mostrou que a fracção de β-ácidos diminuiu a atividade GABAérgica de uma forma dependente da dose. Em conclusão, a fração de β-ácidos pode ser considerado como o constituinte principal responsável pelo efeito sedativo melhorado e para o estabelecimento antidepressivo observado após a administração de extrato de lúpulo CO_2 (ZANOLI & ZAVATTI, 2008).

Apesar destes estudos recentes, a identidade do princípio ativo sedativo do lúpulo bem como os mecanismos de ação ainda é questionável (ZANOLI & ZAVATTI, 2008).

Um dos artigos mais atuais teve o objetivo de analisar o efeito sedativo do lúpulo de uma cerveja sem álcool e o ritmo de sono em uma população estressada pelo trabalho.

Segundo Franco *et al.* (2012), o lúpulo, um componente da cerveja, é uma planta cuja atividade farmacológica é principalmente devido às suas resinas amargas, em particular para o ácido 2-metil-3-buten-2-ol, um produto de degradação. O mecanismo de ação da resina do lúpulo consistiria em elevar os níveis do neurotransmissor (GABA), um neurotransmissor inibidor que atua no sistema nervoso central (SNC). Na conclusão do seu trabalho foi relatado que os componentes do lúpulo de cerveja não alcoólica favorecem o descanso noturno, devido, em particular, a sua composição.

O lúpulo contém um composto além dos alfa-ácidos e beta-ácidos que chama muita atenção por conter propriedades medicinais, farmacêuticas e atividades biológicas, segundo um artigo de revisão de SREČEC *et al.*, lúpulos secos contém 1% de xanthohumol, que se encontra nas glândulas de lupulina em conjunto com

alfa-ácidos e beta-ácidos e óleos essenciais, esses flavonóides são conhecidos por terem efeitos antialérgicos, antiinflamatórios, antivirais, antifúngicos, antibacteriana, antioxidante e efeitos antiproliferativos confirmados *in vitro* (SREČEC *et al*., 2011).

Segundo Srečec *et al.* (2011), diversos estudos e artigos científicos foram publicados, os componentes bioativos do lúpulo vem sendo estudados e alguns resultaram em patentes.

2. METODOLOGIA

As amostras de diferentes variedades de *Humulus lupulus* L. foram compradas de um único distribuidor que comercializa insumos para microcervejarias, foram utilizadas para o método de análise a sua forma em pellets. Utilizou-se o espectrofotômetro da marca Shimadzu modelo UV-1203 para os procedimentos analíticos.

Para realizar o preparo da amostra triturou-se uma pequena quantidade de lúpulo em pellets de cada variedade em um gral de vidro com pistilo e pesou-se 4 amostras de cada variedade com 250 mg em balança analítica. Transferiu-se quantitativamente para os tubos de ensaio com tampa, as amostras foram mantidas sob agitação de 30 minutos em solução com 5 mL de tolueno, após pipetou-se 1,5 mL para os microtubos de plástico graduados de 2 mL (Eppendorf). Em seguida centrifugou-se as amostras a 3000 rpm por 10 minutos, para separação dos resíduos. Após essa etapa pipetou-se 250 µL da solução de lúpulo para tubos de ensaio contendo 4,75 mL de metanol, totalizando a solução com 5 mL (Diluição A).

Para aplicação das etapas posteriores da leitura pelo método de Espectrofotometria UV-Vis, pipetou-se 200 µL de NaOH 6,0 N para 100 mL de metanol, para o preparo da solução de metanol alcalino e reservado a solução.

Para realizar o preparo do branco pipetou-se 250 µL de tolueno com 4,75 mL de metanol (Diluição A).

Para a calibração do branco para as amostras pipetou-se 200 µL do branco preparado anteriormente com 4 mL de metanol alcalino, em seguida agitou-se e zerou-se o equipamento (Diluição B).

Para realizar a leitura da amostra pipetou-se 200 µL da solução de lúpulo com metanol para 4 mL de metanol alcalino (diluição B), em seguida agitou-se

manualmente e foram transferidas para as cubetas de espectrofotômetro que foram submetidas a leitura em comprimentos de onda de 275 nm, 325 nm, 355 nm.

Através das equações abaixo é possível realizar a quantificação dos α-ácidos e β-ácidos. O “d” é o fator de diluição (PRIEST & STEWART, 2006).

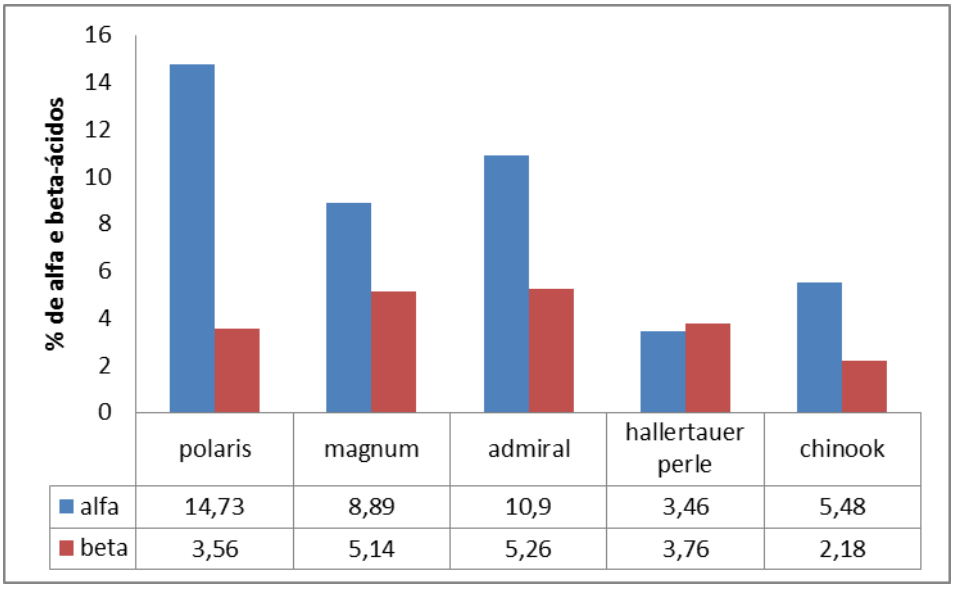
$$\% \text{ alfa ácidos} = d \times (-51.56\ A355 + 73.79\ A325 - 19.07\ A275)$$

$$\% \text{ beta ácidos} = d \times (55.57\ A355 - 47.59\ A325 + 5.10\ A275)$$

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

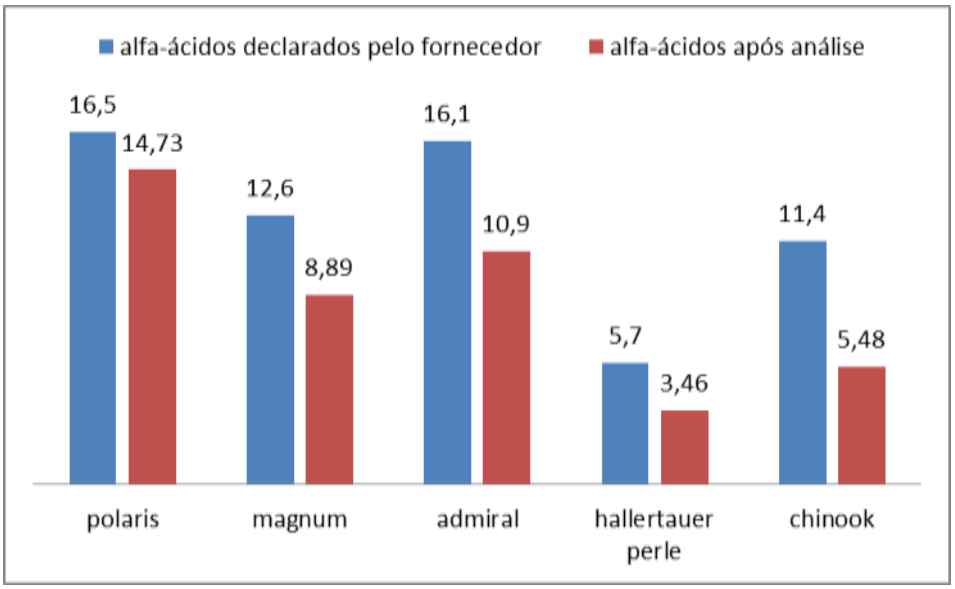
Segundo a *American Society of Brewing Chemists* (ASBC), uma das principais funções do lúpulo na fabricação de cerveja é fornecer parte dos componentes que caracterizam o amargor da cerveja. Os α-ácidos são os precursores primários de substâncias que dão características de amargor a cerveja e, como tal, a sua avaliação é necessária e se torna um procedimento analítico importante. Durante o experimento foram submetidos à análise 5 variedades de lúpulo e foram obtidos os seguintes resultados:

Gráfico 1 – Teor de α e β-ácidos das amostras que foram submetidas à análise



O teor de α-ácidos após análise demonstram ser menores em comparação ao teor declarado de α-ácidos na embalagem e no certificado de análise emitido pelo fornecedor, estes dados estão representados no Gráfico 2:

Gráfico 2 – Teor de α-ácidos das amostras que foram submetidas à análise em relação aos teores declarados pelo fornecedor



Como já descrito por Eßlinger (2009), os alfa-ácidos degradam-se conforme o tempo e condições de armazenamento, através da oxidação desses compostos. Isso explica a perda de α-ácidos durante o armazenamento e consequentemente o seu potencial de amargor. Segundo Verzele (1986), em um ou dois anos, a oxidação das *humulonas* e de outros α-ácidos é uma das mais importantes ocorrências químicas pelo qual o lúpulo e seus derivados deterioram-se e perdem seus conteúdos de α-ácidos, o mesmo autor classifica esses lúpulos em seu artigo como “old hops” (velhos lúpulos).

Entretanto, segundo Priest & Stewart (2006), algumas variedades são notavelmente estáveis e deterioram-se lentamente em temperatura ambiente, enquanto outras variedades que são significamente instáveis deterioram-se mesmo em condições de armazenamento abaixo de zero, essa instabilidade é observada por perda de α e β-ácidos.

A análise espectrofotométrica do percentual de α-ácidos reais, ou seja, após análise laboratorial da concentração dos α-ácidos declarados na embalagem, é essencial para a determinação do potencial de amargor, o teor após análise pode ser inserido em uma equação, utilizando a tabela de utilização de Glenn Tinseth, que é um fator correspondente entre densidade inicial/*original gravity* (OG) em função do tempo de fervura, para a determinação do potencial de amargor (IBU).

A partir dos teores de α-ácidos, foram calculados o potencial de amargor das amostras de lúpulo utilizando a fórmula de IBU preconizada por Palmer (2006), conforme Gráfico 3, através da fórmula:

$$IBU = AAU \times U \times 75 / V$$

Sendo:

AAU = Alpha-Acids Units (Peso em onças (*oz*) x % α-ácidos)

U = Utilization (Glenn Tinseth)

V = Volume da receita em *US gal (galões americanos)*

Utilizando os seguintes parâmetros:

Quantidade: 50 g equivale a 1,76 oz

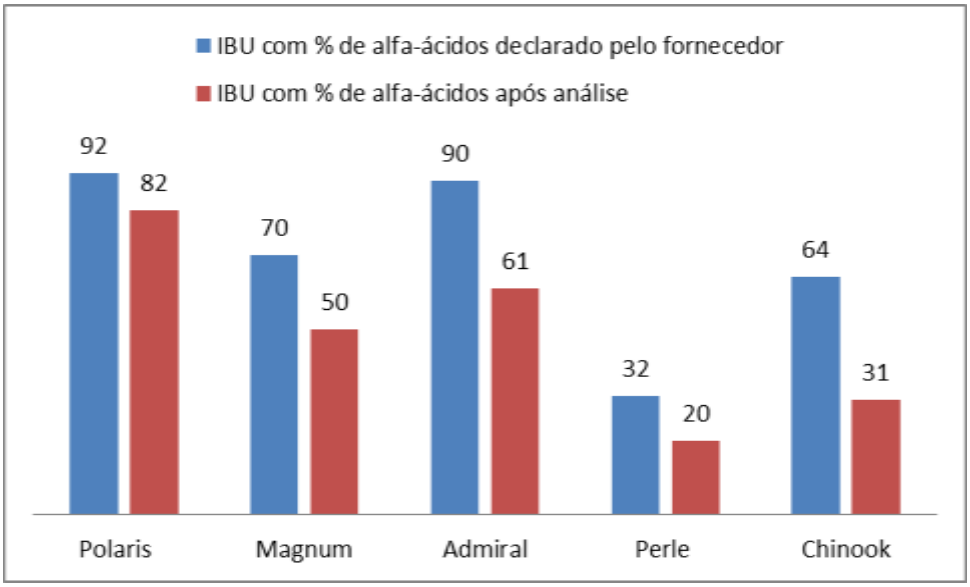
Volume: 20 litros equivale 5,5 galões americanos

Densidade inicial do mosto: 1.050

Tempo de Fervura: 60 min.

Utilization (Glenn Tinseth): .231

Gráfico 3 – Potencial de amargor das amostras relacionadas a concentração de α-ácidos declarados pelo fornecedor em comparação com a análise posterior pelo método de espectrofotometria.



3 CONCLUSÃO

As amostras foram avaliadas e apresentam teores de alfa-ácidos menores que o descrito pelo fornecedor.

Ao analisar as amostras observou-se que houve aproximação dos teores individuais nos resultados obtidos em cada variedade. Os teores de alfa-ácidos encontrados são diferentes daqueles declarados pelos fornecedores, teores sempre menores, indicando degradação da amostra, conforme literatura, por oxidação.

Calculando-se o potencial de amargor ou a força de amargor do lúpulo dentro dos parâmetros descritos, é visível que com a degradação e perda do teor de α-ácidos, o IBU consequentemente é diminuído, indicando um potencial de amargor menor comparado com o potencial de amargor utilizando o teor de α-ácidos declarado pelo fornecedor. Com a determinação dos α-ácidos por análise espectrofotométrica e o cálculo prévio do IBU pode-se planejar a quantidade de lúpulo a ser empregada na preparação da cerveja para se atingir determinado amargor (IBU) a fim de se padronizar uma formulação ou planejar novas fermentações.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHÉ LABORATÓRIOS FARMACÊUTICOS. **Bula Remilev.** Aché, 2015. Disponível em <http://www.ache.com.br/arquivos/Remilev26-03-2015.pdf > Acesso em: 10 Agosto de 2016.

ALCARDE, A.R.; HORII, J.; NOBREI, T.P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 20-25, jan./mar. 2007.

ASBC Methods of Analysis. **Hops Method 6. α-and β-Acids by Spectrophotometry.** American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, U.S.A., 2010. Disponível em: < http://methods.asbcnet.org/summaries/hops-6.aspx> Acesso em: 11 de Agosto de 2016.

ALMAGUER, Cynthia; SCHÖNBERGER, Christina; GASTL, Martina; ARENDT, Elke K.; BECKER, Thomas. *Humulus lupulus* – a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing,** London, England, v. 120, n. 4, p. 289-314, jun./jul., 2014.

CHRISTENSEN, Jakob; LADEFOGED, Anne Marie; NØRGAARD, Lars. Rapid Determination of Bitterness in Beer Using Fluorescence Spectroscopy and

Chemometrics. **Journal of the Institute of Brewing,** London, England, v. 111, n. 1, p. 3-10, 2005.

CUNHA, A. Proença; SILVA, Alda Pereira; ROQUE, Odete Rodrigues. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia.** 1ª Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

DE KEUKELEIRE, Denis. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 1, p. 108-112, Feb. 2000.

EßLINGER, Hans Michael. **Handbook of brewing. Processes, Technology, Markets**. 1ª Edição. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.

FINTELMANN, Volker; WEISS, Rudolf Fritz. **Manual de Fitoterapia.** 11ª. Edição. Guanabara: Koogan, 2010.

FRANCO, Lourdes; SÁNCHEZ, Cristina; BRAVO, Rafael; RODRÍGUEZ, Ana B.; BARRIGA, Carmen; ROMERO, Eulalia; CUBERO, Javier. The Sedative Effect of Non-Alcoholic Beer in Healthy Female Nurses. **Journal PLoS ONE**, Université Pierre et Marie Curie, France, v.7, n.7, p.1-6, 2012.

HIERONYMUS, Stan. **For the love of hops : the practical guide to aroma, bitterness, and the culture of hops.** 1ª Edição. Colorado: Brewers Association, 2012.

HOPSTEINER. **Analytical Methods for Hops and Hop Products.** Hopsteiner, 2011. Disponível em <http://www.hopsteiner.com/news/type/newsletters/page/5/> Acesso em: 11 de Agosto de 2016.

JASKULA-GOIRIS, Barbara; AERTS, Guido; DE COOMAN, Luc. Hop α-acids isomerisation and utilisation: an experimental review. **Elselvier B.V**, Ghent, Belgium, v. 35, n.1, p. 57-70, 2010.

KONDA, Veera Reddy; DESAI, Anuradha; DARLAND, Gary; BLAND, Jeffrey S.; TRIPP, Matthew L. *Rho* iso-alpha acids from hops inhibit the GSK-3/NF-κB pathway and reduce inflammatory markers associated with bone and cartilage degradation. **Journal of Inflammation**, London, England, v. 6, n. 26, p. 1-9, 2009.

MARIA, Tofană; MUDURA, Elena; MUSTE, Sevastiţa; SOCACI, Sonia Ancuţa; MUREŞAN, Crina. The validation of the HPLC Hop Bitter acids method. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies,** Cluj-Napoca, Romania, v. 15, n.1, p. 50-54, 2009.

MARQUES, Tamara Rezende; PEREIRA, Luciana Lopes Silva; SIMÃO, Anderson Assaid; RAMOS, Vinicius de Oliveira; BRAGA, Mariana Aparecida; CORRÊA, Angelita Duarte; SANTOS, Custodio Donizete. Inibição de enzimas digestivas por pellets de lúpulo (*Humulus lupulus* L.). **Revista Brasileira de Biociências,** São Paulo, v.12, n.4, p. 183-187, out./dez. 2014.

OLIVA-NETO, P.; YOKOYA, F. Susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* and Lactic Acid Bacteria from the alcohol industry to several antimicrobial compounds. **Brazilian Journal of Microbiology,** São Paulo, v. 32, n. 1, p. 10-14, 2001.

PALMER, John J. **How to brew : ingredients, methods, recipes and equipment for brewing beer at home.** 3ª Edição. Colorado: Brewers Publications, 2006.

PRADO, Josimara Lacerda; VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni. Uso de Antibióticos Convencionais e Antimicrobianos a Base de Lúpulo no controle da infecção bacteriana em fermentação alcóolica. **Revista Energia na Agricultura,** Botucatu, v. 29, n. 4, p. 277-281, outubro-dezembro, 2014.

PRIEST, Fergus G., STEWART, Graham G. **Handbook of brewing.** 2ª Edição: Flórida: Taylor & Francis Group, 2006.

SAHLSTROM, Adam; ROSTAD, Stephen. HPLC determination of α- and β-acids in hops**. Concordia College Journal of Analytical Chemistry**, Moorhead, United States, n. 2, p. 78-83, 2011.

SCHÖNBERGER, C; KOSTELECKY; T. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. **Journal of the Institute of Brewing,** London, England, v. 117, n. 3, p. 259-267, 2011.

SREČEC, Siniša; ZECHNER-KRPAN, Vesna; PETRAVIĆ-TOMINAC, Vlatka; KOŠIR, Iztok Jože; ČERENAK, Andreja. Importance of Medical Effects of Xanthohumol, Hop (*Humulus lupulus* L.) Bioflavonoid in Restructuring of World Hop Industry. **Agriculturae Conspectus Scientificus,** Zagreb, Croatia, v.77, n. 2, p. 61-67, abr./jul. 2011.

SŁAWINSKA-BRYCH, Adrianna; KROL, Sylwia Katarzyna; DMOSZYNSKA-GRANICZKA, Magdalena; ZDZISINSKA, Barbara; STEPULAK, Andrzej; GAGOS, Mariusz. Xanthohumol inhibits cell cycle progression and proliferation of larynx cancer cells in vitro, **Chemico-Biological Interactions,** Elsevier Ireland, v. 240, p. 110-118, abr./ago. 2015.

TANIGUCHI, Yoshimasa; TANIGUCHI, Harumi; YAMADA, Makiko; MATSUKURA, Yasuko; KOIZUMI, Hideki; FURIHATA, Kazuo; SHINDO, Kazutoshi. Analysis of the Components of Hard Resin in Hops (*Humulus lupulus* L.) and Structural Elucidation of Their Transformation Products Formed during the Brewing Process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Tokyo, Japan, v. 62, n. 47, p. 11602−11612, out./out. 2014.

VERZELE, M. Centenary review 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing. **Journal of the Institute of Brewing,** London, England, v. 92, n. 1, p. 32-48, jan./feb., 1986.

ZANOLI, Paola; ZAVATTI, Manuela. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. **Journal of Ethnopharmacology,** Elsevier Ireland, v.116, n. 3, p. 383-396, jan./jan. 2008.