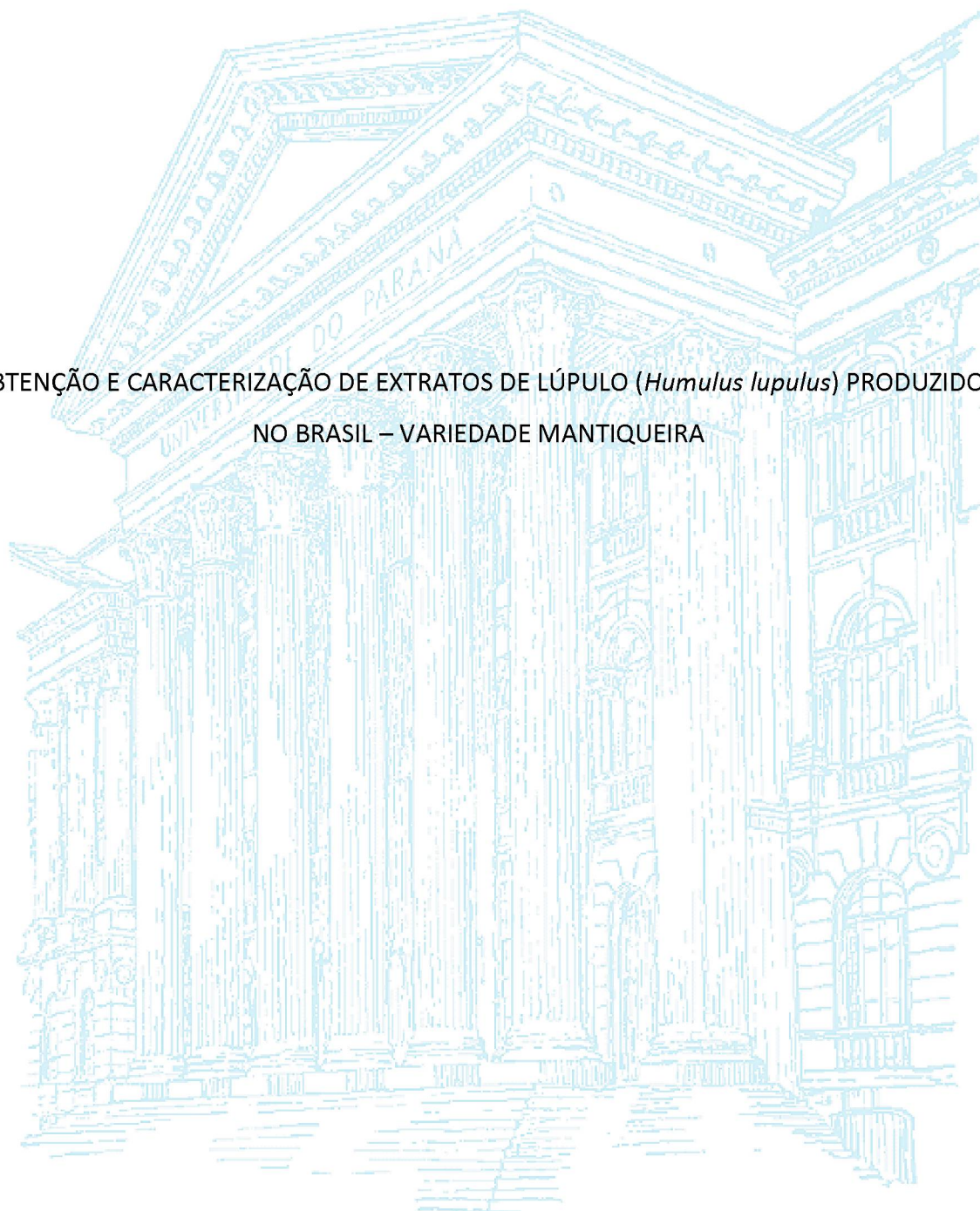


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO AGUILAR VEIGA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE LÚPULO (*Humulus lupulus*) PRODUZIDO
NO BRASIL – VARIEDADE MANTIQUEIRA



CURITIBA

2023

BRUNO AGUILAR VEIGA

OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE LÚPULO (*Humulus lupulus*) PRODUZIDO
NO BRASIL – VARIEDADE MANTIQUEIRA

Tese de doutorado apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de doutor em Engenharia de
Alimentos, no Programa de Pós-Graduação de
Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Agnes de Paula Scheer

Coorientadores: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

Prof. PhD. Massimiliano Errico

CURITIBA

2023

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Veiga, Bruno Aguilar

Obtenção e caracterização de extratos de lúpulo (*Humulus lupulus*)
produzido no Brasil – variedade Mantiqueira / Bruno Aguilar Veiga. – Curitiba,
2023.

1 recurso on-line : PDF.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Agnes de Paula Scheer

Coorientadores: Marcos Lúcio Corazza; Massimiliano Errico

1. Lúpulo. 2. Antioxidantes. 3. Propano. 4. *Humulus*. 5. Xanthohumol. I.
Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos. III. Scheer, Agnes de Paula. IV. Corazza, Marcos
Lúcio. V. Errico, Massimiliano. VI. Título.

Bibliotecário: Elias Barbosa da Silva CRB-9/1894



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016018P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **BRUNO AGUILAR VEIGA** intitulada: *Obtenção e caracterização de extratos de lúpulo (*Humulus lupulus*) produzido no Brasil - variedade Mantiqueira.*, sob orientação da Profa. Dra. AGNES DE PAULA SCHEER, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 14 de Março de 2023.

Assinatura Eletrônica
17/03/2023 20:00:51.0
AGNES DE PAULA SCHEER
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica
16/03/2023 20:45:33.0
MARIA LUCIA MASSON
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
17/03/2023 13:52:37.0
EDSON ANTONIO DA SILVA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
16/03/2023 19:49:50.0
LUÍS RICARDO SHIGUEYUKI KANDA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica
20/03/2023 12:13:27.0
JOSÉ AUGUSTO PAIXÃO COELHO
Avaliador Externo (INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA)

Dedico este trabalho ao meu irmão e aos meus pais Roberto (in memoriam) e Berenice, com todo o amor e gratidão, por todo incentivo e paciência durante toda a minha vida. Sou grato pela família que Deus me deu. Amo todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha orientadora Profa. Dra. Agnes de Paula Scheer, pelo companheirismo, paciência, todo o suporte e a confiança depositada em mim, que possibilitaram o meu desenvolvimento pessoal e profissional culminando nesse trabalho. Ao meu coorientador prof. Dr. Marcos L. Corazza, pela amizade, o apoio e os ensinamentos que tornaram possível a realização desse trabalho. Ao meu coorientador prof. PhD Massimiliano Errico, pelo acolhimento e recepção calorosa na SDU, sem sua confiança e aconselhamentos esse trabalho não teria sido possível.

Aos meus pais Roberto (*in memoriam*) e Berenice, meu irmão Gustavo, meus avós Clóris, os saudosos Enis, Estanislau e Wilson, meus tios e tias. Todos os familiares que de alguma forma contribuíram nessa jornada sintam-se lembrados e não há palavras que façam jus a minha gratidão.

Aos amigos desde os tempos de colégio Alisson, Diego, Felipe, Miroel, Ricardo e Thiago que sempre estiveram presentes nos momentos difíceis e de alegria. Os quais tornaram o processo mais leve, tanto com palavras, quanto com a presença.

Aos amigos que fiz na UFPR, colegas de muitos momentos e companheiros de laboratório Ana Ferrari, Alexis Escorsim, Aline Andreza, Damian López, Giulia Herbst, Julia Trancoso, Kallynca Carvalho, Luiz Kanda e Wanderson Giacomini Júnior, todos vocês ajudaram a tornar mais leve o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos que fiz na SDU durante os seis meses mais desafiadores da minha vida até então, André Rodrigues, Claudio Madeddu, Jens Jakob Sigurdarson, Liubov Vasenko, Manuella Lech Cantuaria, Maria Cinta Roda-Serrat, Marina Linova, Morten Mørk Jensen, Pau Ibarra, Signe Helle Ptak e Thalles Andrade, quem me apresentou esse grupo sensacional. Todos vocês foram essenciais na minha adaptação dentro e fora da universidade. Destaco aqui a paciência da Cinta e os ótimos momentos com o Thalles, Liubov e Claudio. Thanks guys, you are awesome!

À pós-doutoranda Fabiane Hamerski, os seus ensinamentos diários foram imprescindíveis para a realização do trabalho. Agradeço a paciência, a atenção e todo o apoio nas análises.

Aos colegas dos laboratórios LACTA e EMULTEC pela troca de experiências no dia a dia, pelas ajudas nas análises. Aos gestores dos laboratórios, muito obrigado pela infraestrutura e

tempo dedicado ao trabalho, destacando os professores e professoras: Marcos Corazza, Fernando Voll, Agnes Scheer e Vitor da Silva.

A UFPR Instituição onde me graduei e obtive meu grau de mestre em engenharia química, posteriormente me possibilitou iniciar o doutorado no Programa de Pós-Graduação Engenharia de Alimentos e um estágio na Dinamarca. Essa instituição modifica vidas e possibilita a evolução da sociedade no seu entorno. Na UFPR me tornei profissional, pesquisador e um ser melhor. Serei sempre grato ao ensino público e de qualidade ao qual tive acesso graças a contribuição de toda a sociedade brasileira.

A Capes que me concedeu as condições financeiras para me dedicar ao doutorado e ter uma vida digna durante esse período, também agradeço a bolsa de doutorado sanduíche que possibilitou uma evolução substancial no meu trabalho e na minha formação acadêmica. Esse órgão deve ser valorizado pela sociedade por fomentar a pesquisa científica brasileira de maneira consistente há muitos anos.

Aos colegas do programa de pós graduação e a todos aqueles que não foram citados nominalmente, mas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Se vi mais longe, foi por estar sobre os ombros de Gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

As inflorescências, também conhecidas como cone ou flor, do lúpulo (*Humulus lupulus*) são utilizadas como um dos principais ingredientes da cerveja. Essa planta tem ação antioxidante e bacteriostática reconhecidas além das características sensoriais. Devido a esse conjunto de características o lúpulo vem sendo produzido em diferentes regiões do mundo, principalmente na Europa e Estados Unidos da América. O óleo essencial do lúpulo é constituído por mais de 35 compostos orgânicos, dentre eles vários são compostos fenólicos com destaque ao resveratrol e xanthohumol. A composição dos extratos de lúpulo confere um grande potencial antioxidante e antimicrobiano. O Brasil é um dos oito maiores importadores de lúpulo no mundo, esse fato devido a sua pequena produção, que representa uma fração inferior 0,01 % da produção mundial. Uma nova variedade de lúpulo foi descoberta recentemente, denominada Mantiqueira, a qual se adaptou ao clima brasileiro e vem apresentando resultados promissores de produtividade. A combinação desses fatores motiva o estudo dos extratos obtidos a partir dessa matriz de origem nacional. Visando comparar os rendimentos de diversas técnicas de extração do lúpulo Mantiqueira o mesmo foi submetido a extração por solventes orgânicos (etanol, metanol, acetato de etila e n-hexano), extração com solventes pressurizados (CO₂ supercrítico e propano subcrítico) e extração por líquido expandido com dióxido de carbono, CXL, (CO₂ supercrítico + acetato de etila). Os rendimentos variaram de 2,68 a 10,14% (massa extrato/massa de lúpulo) para extração por fluido pressurizado, PFE, (propano subcrítico) e CXL (CO₂ supercrítico + acetato de etila), respectivamente. A Adição do cossolvente induziu uma redução no tempo médio de extração de 50%. Os extratos foram caracterizados quanto conteúdo de compostos fenólicos, conteúdo de flavonoides, atividade antioxidante e composição utilizando HPLC, onde foram quantificados os alfa-ácidos, beta-ácidos além do xanthohumol. As condições ótimas de temperatura e pressão para a extração com CXL (CO₂ supercrítico + acetato de etila) foram de 80 °C e 25 MPa, resultando em um rendimento de 10,14%, com conteúdo de compostos fenólicos de 156 mg GAE.g⁻¹, conteúdo de flavonoides de 51 mg CE.g⁻¹ e atividade antioxidante de 1,14 mmol TEAC.g⁻¹. A composição do lúpulo estudado, determinada por HPLC, é análoga a lúpulos de origem tcheca e confirma que a variedade Mantiqueira pode ser competitiva no mercado global.

Palavras-chave: *Humulus lupulus*; atividade antioxidante; CO₂ supercrítico; propano comprimido; cossolvente; humulona; lupulona; xanthohumol.

Aplicação

ABSTRACT

The inflorescences of the *Humulus lupulus*, as known as hops, are worldwide recognized as one of the four great ingredients of beer: water, malt, hops and yeast. But this vegetable matrix is much more than a simple beer ingredient, it has antioxidant and bacteriostatic activity in addition to its organoleptic characteristics. Due to this combination of properties, hops have been produced in different regions of the world, mainly in Europe and the United States of America. The essential oil of hops consists of more than 35 organic compounds, among which several are phenolic compounds with emphasis on resveratrol and xanthohumol. The composition of hop extracts confers great antioxidant and antimicrobial potential. Brazilian production represents a fraction smaller than 0.01% of world production, even though the country ranks among the eight largest hop importers in the world. Recently a new variety of hops was discovered and called Mantiqueira, which has adapted to the Brazilian climate and has been showing promising productivity results. The combination of these factors motivates the study of extracts obtained from this matrix of Brazilian origination. In order to compare the yields of different extraction techniques, Mantiqueira hops were subjected to extraction with organic solvents (ethanol, methanol, ethyl acetate and n-hexane), extraction with pressurized solvents (supercritical CO₂ and subcritical propane) and liquid extraction. Expanded with carbon dioxide, CXL, (supercritical CO₂ + ethyl acetate). Yields ranged from 2.68 to 10.14% (extract mass/hop mass) for pressurized fluid extraction, PFE, (subcritical propane) and CXL (supercritical CO₂ + ethyl acetate), respectively. Addition of the cosolvent induced a reduction in the average extraction time of 50%. The extracts were characterized in terms of total phenolic content (TPC), total flavonoid content (TFC), antioxidant activity and composition using HPLC, where alpha-acids, beta-acids and xanthohumol were quantified. The best conditions of temperature and pressure, observed in this study, for extraction with CXL (supercritical CO₂ + ethyl acetate) were 80 °C and 25 MPa, resulting in a yield of 10.14%, with a phenolic compound content of 156 mg GAE.g⁻¹, flavonoid content of 51 mg CE.g⁻¹ and antioxidant activity of 1.14 mmol TEAC.g⁻¹. The composition of the hops studied, determined by HPLC, is analogous to hops of Czech origin and confirms that the Mantiqueira variety is competitive in the global market.

Key words: *Humulus lupulus*; antioxidant activity; supercritical CO₂; pressurized propane; co-solvent; lupulone; humulone; xanthohumol.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2-1 - PRODUÇÃO E REPRESENTAÇÃO DOS CONES DO LÚPULO (HUMULUS LUPULUS)	23
FIGURA 2-2 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DO CONE DE LÚPULO	24
FIGURA 2-3 - POLIFENÓIS ENCONTRADOS NO LÚPULO	25
FIGURA 2-4 - SISTEMA DE EXTRAÇÃO POR SOLVENTES ORGÂNICOS (SOXHLET)	35
FIGURA 2-5 - DIAGRAMA DE FASES PRESSÃO EM FUNÇÃO DE TEMPERATURA PARA O CO ₂	38
FIGURE 3-1 - OVERALL EXTRACTION CURVES OF FBH USING (A) SCCO ₂ , AND (B) PROPANE AS THE SOLVENT.	59
FIGURE 3-2 - OVERALL EXTRACTION CURVES FOR SCCO ₂ + ETOAC AT DIFFERENT ETOAC TO SOLIDS MASS RATIO: (A) 2:1 AND (B) 1:1	61
FIGURE 33 - ETHYL ACETATE (WT%) REMAINING INSIDE THE EXTRACTOR VESSEL (CALCULATED BY MASS BALANCE) IN SEMI-BATCH SCCO ₂ +ETHYL ACETATE EXTRACTIONS AT COSOLVENT TO SOLIDS MASS RATIO (MR) OF 2:1	62
FIGURA 4-1 - METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE LÚPULO POR HPLC	68
FIGURA 4-2 - CURVA DE COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL AO LONGO DO TEMPO DE INJEÇÃO NO MÉTODO CROMATOGRÁFICO UTILIZADO NO ESTUDO DE BESSADA.....	71
FIGURA 4-3 - CURVA DE COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL AO LONGO DO TEMPO DE INJEÇÃO NO MÉTODO CROMATOGRÁFICO UTILIZADO NESTE TRABALHO	72
FIGURA 4-4 - CROMATOGRAMA TÍPICO OBTIDO PELO MÉTODO CROMATOGRÁFICO APLICADO NESSE ESTUDO NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 370 NM	72
FIGURA 4-5 - CURVA DE CALIBRAÇÃO (MAU vs. CONCENTRAÇÃO [MG/ML]) PARA OS SETE COMPOSTOS	77
FIGURA 5-1 - GRADIENTE DA FASE MÓVEL UTILIZADO NA QUANTIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS DO LÚPULO VIA HPLC.....	86
FIGURA 5-2 - COMPOSIÇÃO DO LÚPULO BRASILEIRO VAR. MATIQUEIRA.....	90
FIGURA 5-3 - DIAGRAMA DE PARETO PARA EFEITOS SOBRE A EE DOS ALFAS ÁCIDOS NAS EXTRAÇÕES COM sCCO ₂	96
FIGURA 5-4 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A EE DA HUMULONA NAS EXTRAÇÕES COM sCCO ₂	97
FIGURA 5-5 - DIAGRAMA DE PARETO PARA EFEITOS SOBRE A EE DOS BETAS ÁCIDOS NAS EXTRAÇÕES COM sCCO ₂	98
FIGURA 5-6 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A EE DA LUPULONA NAS EXTRAÇÕES COM sCCO ₂	99
FIGURA 5-7 - DIGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS SOBRE AS EE DOS ALFA ÁCIDOS (ESQUERDA) E BETA ÁCIDOS (DIREITA).....	101
FIGURA 58 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A EE DA HUMULONA NAS EXTRAÇÕES UTILIZANDO PROPANO PRESSURIZADO	102
FIGURA 5-9 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A EE DA LUPULONA NAS EXTRAÇÕES UTILIZANDO PROPANO PRESSURIZADO	103
FIGURA 5-10 - EFEITOS ESTATISTICAMENTE RELEVANTES PARA A EXTRAÇÃO COM sCCO ₂ + ACETATO DE ETILA EM MR=1. CANTO SUPERIOR ESQUERDO, RENDIMENTO. CANTO SUPERIOR DIREITO XANTHOTHUMOL. CANTO INFERIOR ESQUERDO, LUPULONA. CANTO INFERIOR DIREITO, COLUPULONA.	105
FIGURA 5-11 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA EE DO XANTHOTHUMOL OBTIDA PELA EXTRAÇÃO UTILIZANDO UMA MISTURA DE sCCO ₂ + ACETATO DE ETILA EM MR 1.....	106
FIGURA 5-12 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA EE DA LUPULONA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO UTILIZANDO UMA MISTURA DE sCCO ₂ + ACETATO DE ETILA EM MR 1.....	107
FIGURA 5-13 - EFEITOS DE TEMPERATURA, PRESSÃO E SUA COMBINAÇÃO SOBRE O RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO PARA AS EXTRAÇÕES REALIZADAS COM sCCO ₂ + ACETATO DE ETILA MR 2	108
FIGURA 5-14 - EFEITOS DE TEMPERATURA, PRESSÃO E SUA COMBINAÇÃO SOBRE AS EE DOS ALFA ÁCIDOS (ESQUERDA) E BETA ÁCIDOS (DIREITA) PARA AS EXTRAÇÕES REALIZADAS COM sCCO ₂ + ACETATO DE ETILA MR 2.....	110
FIGURA 5-15 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA EE DO XANTHOTHUMOL PARA AS EXTRAÇÕES REALIZADAS COM sCCO ₂ + ACETATO DE ETILA MR 2.....	111

FIGURA 5-16 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA EE DA COHUMULONA PARA AS EXTRAÇÕES REALIZADAS COM $s\text{cCO}_2$ + ACETATO DE ETILA MR 2.....	112
FIGURA 5-17 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA EE DA LUPULONA PARA AS EXTRAÇÕES REALIZADAS COM $s\text{cCO}_2$ + ACETATO DE ETILA MR 2	113

LISTA DE TABELAS

TABELA 2-1 - COMPOSTOS DE INTERESSE NO LÚPULO	26
TABELA 2-2 - COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LÚPULO - COMPOSTOS COM CONCENTRAÇÃO MAIORES QUE 0,1%	27
TABLE 3-1 - EXTRACTION YIELDS OF FBH EXTRACTION BY DIFFERENT ORGANIC SOLVENTS	53
TABLE 3-2 - OVERALL EXTRACTION YIELDS OF FBH USING SFE, PFE, SCCO ₂ +COSOLVENT	56
TABLE 3-3 - TOTAL PHENOLIC CONTENT, TOTAL FLAVONOID CONTENT, AND ANTIOXIDANT ACTIVITY BY DPPH*	65
TABELA 4-1 - TEMPOS DE RETENÇÃO PARA OS PRINCIPAIS COMPOSTOS DO LÚPULO MANTIQUEIRA	74
TABELA 4-2 - COEFICIENTES OBTIDOS DA LINEARIZAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS DO LÚPULO MANTIQUEIRA.....	78
TABELA 5-1 - RESUMO DOS RENDIMENTOS E CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO.....	89
TABELA 5-2 - COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO DE DIFERENTES VARIETAIS DE LÚPULO COM O MANTIQUEIRA..	91
TABELA 5-3 - COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS E EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO.....	92

LISTA DE SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHA	Hidroxianisil butilato
BHT	Hidroxitoleno butilato
CE	Catequina equivalente
CXL	Extração por líquido expandido com dióxido de carbono
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EE	Eficiência de extração
EtOAc	Acetato de etila (etanoato de etila)
EtOH	Etanol
GAE	Equivalente em ácido gálico
GC	Cromatografia em fase gasosa
HPLC	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência
ICE-3	International Calibration Extract 3
mAU	milli-Absorbance Units
MR	Razão mássica (g/g)
PFE	Extração por fluido pressurizado
PC	Pressão crítica
PG	Galato de propila
RPM	Revoluções por minuto
PTFE	Politetrafluoretileno
scCO ₂	Dióxido de carbono supercrítico
SDU	Universidade do Sul da Dinamarca
SFE	Extração por fluido supercrítico
TBHQ	Di-t-butil-hidroquinona
TC	Temperatura crítica
TEAC	Equivalente em Trolox de capacidade antioxidante
TFC	Conteúdo de flavonoides
TPC	Conteúdo de compostos fenólicos

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL.....	17
1.1 OBJETIVOS.....	19
1.1.1 OBJETIVO GERAL.....	19
1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
1.1.2.1 CAPÍTULO 2 - REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1.2.2 CAPÍTULO 3 - COMPRESSED FLUIDS EXTRACTION METHODS, YIELDS, ANTIOXIDANT ACTIVITIES, TOTAL PHENOLICS AND FLAVONOIDS CONTENT FOR BRAZILIAN MANTIQUEIRA HOPS.....	19
1.1.2.3 CAPÍTULO 4 - MÉTODOS CROMATOGRAFICOS.....	19
1.1.2.4 CAPÍTULO 5 - LÚPULO BRASILEIRO: SUA COMPOSIÇÃO E POTENCIAL DO VARIETAL MANTIQUEIRA PARA USO INDUSTRIAL	20
CAPÍTULO 2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS	21
2.2 LÚPULO (HUMULUS LUPULUS)	22
2.2.1 COMPOSIÇÃO MÉDIA DO LÚPULO	24
2.2.2 COMPOSIÇÃO MÉDIA DO ÓLEO ESSENCIAL DO LÚPULO	26
2.2.3 ALFA-ÁCIDOS E BETA-ÁCIDOS DO LÚPULO.....	27
2.2.4 FLAVONOIDES E OUTROS COMPOSTOS DE INTERESSE DO LÚPULO	28
2.3 ANTIOXIDANTES	30
2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	33
2.4.1 EXTRAÇÃO POR SOLVENTES ORGÂNICOS.....	33
2.4.2 EXTRAÇÃO COM FLUIDOS PRESSURIZADOS	36
2.4.2.1 EXTRAÇÃO COM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	36
2.4.2.2 MODIFICADORES DE POLARIDADE	39
2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
CAPÍTULO 3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO COM FLUÍDOS PRESSURIZADOS, RENDIMENTOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CONTEÚDO TOTAL DE FLAVONOIDES E COMPOSTOS FENÓLICOS	42
3.1 INTRODUCTION.....	44
3.2 MATERIAL AND METHODS	46
3.2.1 SAMPLES	46
3.2.2 CHEMICALS.....	47
3.2.3 DETERMINATION OF MOISTURE, VOLATILE COMPOUNDS, AND DENSITY	47
3.2.4 SOXHLET EXTRACTIONS.....	47
3.2.5 EXTRACTION WITH COMPRESSED FLUIDS	48
3.2.5.1 SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION (SFE) AND PRESSURIZED FLUID EXTRACTION (PFE).....	49
3.2.5.2 SUPERCRITICAL CO ₂ + COSOLVENT EXTRACTIONS	49
3.2.6 TOTAL PHENOLICS CONTENT, TOTAL FLAVONOIDS CONTENT, AND ANTIOXIDANT ACTIVITY	50
3.2.6.1 PREPARATION OF SAMPLES	50
3.2.6.2 TOTAL PHENOLIC CONTENT BY FOLIN-CIOCALTEU REAGENT	51
3.2.6.3 TOTAL FLAVONOID CONTENT	51
3.2.6.4 RADICAL SCAVENGING ACTIVITY BY DPPH• ASSAY	51
3.2.7 STATISTICAL ANALYSIS	52
3.3 RESULTS AND DISCUSSION	52
3.3.1 VEGETABLE MATRIX AND SAMPLES.....	52
3.3.1.1 OVERALL EXTRACTION CURVES.....	58
3.3.2 TOTAL PHENOLIC CONTENT, TOTAL FLAVONOID CONTENT, AND ANTIOXIDANT ACTIVITY	62
3.4 CONCLUSIONS.....	66

CAPÍTULO 4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	68
4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE HPLC E OTIMIZAÇÃO	69
4.2 CROMATOGRAFIA PREPARATIVA	73
4.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	75
4.4 CURVAS DE CALIBRAÇÃO.....	75
CAPÍTULO 5 LÚPULO BRASILEIRO: SUA COMPOSIÇÃO E POTENCIAL DO VARIETAL MANTIQUEIRA PARA USO INDUSTRIAL	79
5.1 INTRODUÇÃO	80
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	82
5.2.1 REAGENTES.....	82
5.2.2 AMOSTRAS	82
5.2.2.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	83
5.2.2.1.1 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO PARA AS FLORES DE LÚPULO	83
5.2.2.1.2 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO PARA OS EXTRATOS OBTIDOS POR FLUIDOS PRESSURIZADOS	84
5.2.3 MÉTODO ANALÍTICO	85
5.2.4 ANÁLISE DOS DADOS.....	87
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.3.1 AVALIAÇÃO DE CORRELAÇÃO DE EFEITOS	94
5.4 ANÁLISE DE VARIÂNCIA	95
5.4.1 EXTRAÇÃO COM scCO ₂	95
5.4.2 EXTRAÇÃO COM PROPANO PRESSURIZADO	99
5.4.2.1 EXTRAÇÃO COM scCO ₂ ASSISTIDA POR COSSOLVENTE	103
5.4.2.2 EXTRAÇÃO COM scCO ₂ + EtOAc COM MR 1	104
5.4.2.3 EXTRAÇÃO COM scCO ₂ + EtOAc COM MR 2	107
5.5 CONCLUSÃO	114
5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGETÃO DE ESTUDOS FUTUROS	115
CAPÍTULO 6 REFERÊNCIAS.....	118

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de plantas como fonte de compostos bioativos remete aos primórdios da civilização. Os metabólitos secundários dos vegetais são os principais responsáveis pelas propriedades biológicas das matrizes vegetais (SIMÕES *et al.*, 2007).

O desenvolvimento das técnicas de extração possibilitará a aplicação de derivados de plantas muito além da medicina. Em função disso houve uma retomada ao uso de produtos naturais (LIU; WANG, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2008). Essa tendência se estende à indústria de alimentos, pois as plantas podem ser fontes, mais baratas, de compostos bioativos e ainda são bens renováveis. Os extratos vegetais de interesse da indústria de alimentos devem apresentar potencial antioxidante e antimicrobiano, características desejadas para preservação de alimentos (BAŞER; BUCHBAUER, 2010).

A maior parte dos compostos bioativos são obtidos pela aplicação de extração sólido líquido, que pode utilizar solventes orgânicos ou fluidos pressurizados. Outros métodos também empregados são a hidrodestilação e arraste a vapor. A escolha de qual metodologia deve ser utilizada para cada matriz deve considerar uma série de fatores, como: rendimento de extração, qualidade do extrato, composição final do extrato, custos do processo e condições de temperatura do processo. Temperaturas elevadas devem ser evitadas visando preservar os compostos bioativos, que em grande parte são termolábeis. O uso de solventes orgânicos pode resultar em resíduo de solvente nos extratos, a depender do solvente o produto final pode apresentar toxicidade humana e ambiental, tornando-se impróprio para utilização em alimentos.

O uso de extração por fluidos pressurizados, entre elas a extração por fluido supercrítico (SFE) e extração por fluido pressurizado (PFE), que utilizam como solventes fluídos em alta pressão e em condições de temperatura inferiores a 80 °C, reduzem a degradação de compostos termolábeis (MESOMO *et al.*, 2012). Como os solventes são gasosos em condições de pressão atmosférica, a separação extrato solvente também é mais simples, devido a separação de fases do tipo flash, evitando etapas adicionais (BOCQUET, Laetitia *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2016; SAHENA *et al.*, 2009). O fluido supercrítico mais utilizado é o dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) devido as condições de temperatura e pressão crítica, sendo 31,1 °C e 73,8 bar

respectivamente(COELHO, José et al., 2020). O CO₂ não é inflamável ou explosivo e apresenta seletividade para compostos bioativos. Outro fluido empregado como fluido pressurizado é o propano, que exige menores pressões quando comparado ao CO₂, tem alto poder de solvatação - mesmo em condições subcríticas - e não deixa resíduos tóxicos no extrato (LANZA et al., 2005).

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é um dos principais ingredientes da cerveja, responsável por diferentes intensidades de amargor e uma vasta gama de sabores e aromas que tem um grande impacto nas propriedades sensoriais da cerveja (KORBECKA-GLINKA; SKOMRA; OLSZAK-PRZYBYS, 2016). Entretanto, seu uso não se limita a adição de aromas e sabores à cerveja, o lúpulo foi inicialmente utilizado como agente antimicrobiano e de estabilidade biológica (LAFONTAINE et al., 2019).

Estudos posteriores elevaram o lúpulo de um simples ingrediente da cerveja para o status de planta medicinal, segundo a *European Medicines Agency* (EMA). As flores de lúpulo são utilizadas como base de medicamentos naturais para alívio de sintomas de estresse e para auxílio no sono (BOCQUET, Laetitia et al., 2018).

O óleo essencial do lúpulo apresenta em sua composição mais de 35 diferentes compostos, dentre eles ácidos orgânicos, álcoois, terpenos, ésteres e flavonoides. Além disso a lupulina, pólen gerado nas glândulas das inflorescências do lúpulo, é composta por resinas conhecidas como alfa-ácidos e beta-ácidos, responsáveis pelo sabor amargo e ação de estabilização microbiológica da cerveja (POŁEĆ et al., 2019; STEVENS; PAGE, 2004). O lúpulo contém compostos fenólicos classificados como ácidos carboxílicos fenólicos (ácido ferúlico), flavonoides e polifenóis. Entre os polifenóis, o resveratrol e o xanthohumol são os prenilflavonóides mais abundantes (BIENDL, 2009).

Diante disso fica estabelecida a importância do estudo dessa nova variedade de lúpulo. A motivação desse trabalho é estudar os rendimentos de extração e qualidade de extrato obtidos a partir do lúpulo Mantiqueira empregando diferentes técnicas de extração com fluidos pressurizados. Dessa forma será possível avaliar se o lúpulo brasileiro tem características comparáveis às variedades de lúpulos produzidas nos países com grande tradição no cultivo, tais como Estados Unidos, Inglaterra, República Tcheca, Alemanha e Austrália.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a composição do lúpulo (*Humulus lupulus*) variedade Mantiqueira e de seus extratos obtidos por extração utilizando fluidos pressurizados.

1.1.2 Objetivos específicos

1.1.2.1 Capítulo 2 - Revisão da literatura

- a) Apresentar revisão e contextualização do estudo

1.1.2.2 Capítulo 3 - *Compressed fluids extraction methods, yields, antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content for brazilian mantiqueira hops*

- a) Determinar os efeitos da temperatura e pressão sobre o rendimento global de extração utilizando scCO₂, scCO₂ + Acetato de etila (EtOAc) e propano pressurizado como solventes;
- b) Determinar curvas cinéticas de extração supercrítica, extração supercrítica assistida por cossolvente e com fluido pressurizado;
- c) Avaliar e comparar atividade antioxidante, conteúdo de compostos fenólicos e conteúdo de flavonoides para os extratos obtidos.

1.1.2.3 Capítulo 4 - Métodos cromatográficos

- a) Adaptar metodologia de identificação e quantificação de compostos fenólicos para identificação dos sete compostos mais abundantes do lúpulo em apenas uma análise de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC);

- b) Produzir padrões dos compostos adhumulona, humulona, cohumulona, adlupulona, lupulona, colupulona e xanthohumol a partir da purificação e isolamento de extratos concentrados de lúpulo.

1.1.2.4 Capítulo 5 - Lúpulo brasileiro: sua composição e potencial do varietal Mantiqueira para uso industrial

- a) Quantificar através de HPLC as concentrações dos sete principais compostos do lúpulo - adhumulona, humulona, cohumulona, adlupulona, lupulona, colupulona e xanthohumol - nos extratos e na matriz vegetal liofilizada;
- b) Determinar a composição média do lúpulo brasileiro;
- c) Correlacionar as condições de extração e solventes utilizados com a composição dos extratos obtidos por técnicas avançadas de extração.

CAPÍTULO 2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS VEGETAIS

Um óleo essencial pode ser definido de maneira simplificada como um material volátil com aroma característico, devido a uma mistura complexa rica em terpenóides (REVERCHON, 1997). Esses óleos podem ser obtidos de diferentes frações de plantas, com destaque para as flores, folhas, raízes e sementes. Apresentam aparência oleosa, odor característico, são voláteis e normalmente tem alto valor agregado. Na maioria dos casos são pouco solúveis em água e apresentam boa solubilidade em solventes orgânicos. De composição variável, normalmente são compostos por hidrocarbonetos terpênicos, álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, furanos, óxidos, entre outros (COSTA et al., 2015; NAJAFIAN, 2014; SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais são compostos principalmente por terpenóides, também conhecidos apenas por terpenos. São metabolitos secundários de vegetais que atuam em processos de interação entre plantas e o meio ambiente. Essas substâncias são compostas de unidades de isopreno e comumente são classificadas pelo tamanho da cadeia carbônica. São biossintetizados pelas plantas utilizando enzimas e outros substratos (BAŞER; BUCHBAUER, 2010; KESZEI; BRUBAKER; FOLEY, 2008).

A ISO 9235.2, norma da *International Standard Organization*, regulamenta e define que um produto só pode ser denominado óleo essencial se obtido através de destilação por arraste com vapor de água. Dessa maneira, os produtos obtidos de matrizes vegetais por métodos distintos, incluindo a extração supercrítica e com fluidos pressurizados, não devem ser classificados como óleo essencial. Esses produtos são denominados extratos vegetais (BAŞER; BUCHBAUER, 2010). Nos extratos vegetais podem estar presentes ácidos graxos, pigmentos, cumarinas, esteróis, flavonoides, entre outros (REVERCHON, 1997).

Tanto os óleos essenciais, quanto os extratos vegetais possuem uma ampla aplicação em diferentes setores da indústria de alimentos, de fármacos e de biotecnologia. Inicialmente aplicados apenas de forma medicinal, hoje são

majoritariamente utilizados como ingredientes de sabor e aroma (NAJAFIAN, 2014). Assim sendo, a demanda pelos extratos cresceu, fazendo com que a pesquisa por novas matrizes e novas metodologias de extração sejam fundamentais (BAŞER; BUCHBAUER, 2010).

2.2 LÚPULO (*Humulus lupulus*)

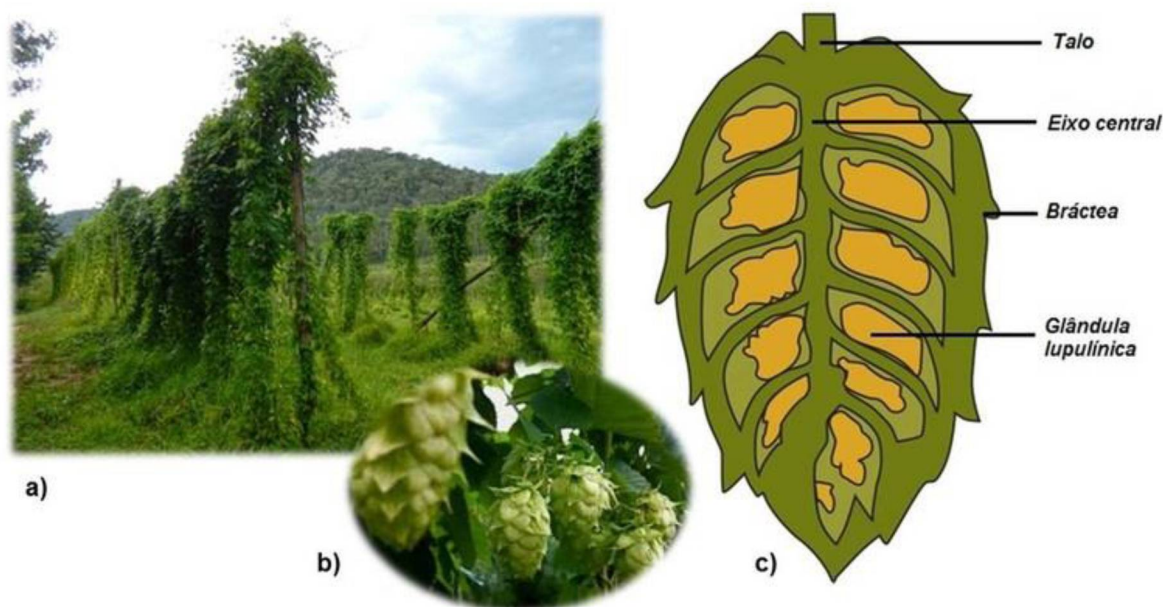
O Humulus lupulus é uma planta dioica, perene, herbácea da família *Cannabaceae*, nativa da Europa, Ásia ocidental e América do Norte. É uma trepadeira que pode atingir 6,1 m e possui flores polinizadas pelo vento (PALMER, 2006). Apenas a planta feminina produz as inflorescências, também denominados cones, onde as glândulas de lupulina estão localizadas, nas quais são encontrados óleos essenciais e resinas. A morfologia da inflorescência do lúpulo é representada na FIGURA 2-1. O grande valor comercial dessa planta é proveniente da sua aplicação na produção da cerveja. A lupulina é responsável por fornecer sabor e aroma à cerveja (devido aos óleos essenciais e resinas). O amargor característico da bebida é proveniente dos iso-alfa-ácidos, que são resultado da isomerização a quente dos alfa-ácidos. Estes ácidos são os principais componentes das resinas presentes no lúpulo.

Por ser um conservante natural passou a ser empregado largamente na produção de cerveja. As flores de lúpulo eram adicionadas diretamente ao barril de cerveja já fermentada, essa prática mantinha as características da cerveja fresca por um período prolongado, ideal para as longas viagens marítimas. Na virada do século XVIII, os cervejeiros britânicos começaram a enviar cerveja forte, com muito lúpulo adicionado aos barris para preservar a bebida durante a viagem até a Índia, assim surgiram as *India Pale Ale* (PALMER, 2006).

Entretanto a primeira citação ao lúpulo como ingrediente na elaboração de cervejas é muito mais antiga, ela é encontrada na epopeia nacional da Finlândia, a Kalevala, compilada por Elias Lönnrot. Esse documento remete a períodos anteriores a 1000 a.C., no entanto a compilação de tais documentos só ocorreu no século XIX, tornando essa referência mais subjetiva (NEVE, 1991).

O primeiro campo de cultivo de lúpulo, no distrito de Hallertau na Alemanha, foi registrado na data de 736 no jardim de um prisioneiro de origem eslava (STEWART, 2004). Em 1516, o duque Guilherme IV da Baviera, instituiu a conhecida Lei de Pureza da Cerveja, *Reinheitsgebot*, que determinava que os únicos insumos utilizados na elaboração da cerveja fossem a água, malte e lúpulo (BIENDL, 2009).

FIGURA 2-1 - PRODUÇÃO E REPRESENTAÇÃO DOS CONES DO LÚPULO (*Humulus lupulus*)



FONTE: SILVA, P. F., 2016

- LEGENDA:
- a) Plantação típica de lúpulo (*Humulus lupulus*)
 - b) Detalhe dos cones (flores de plantas fêmeas)
 - c) Representação das partes que compõem uma flor de lúpulo

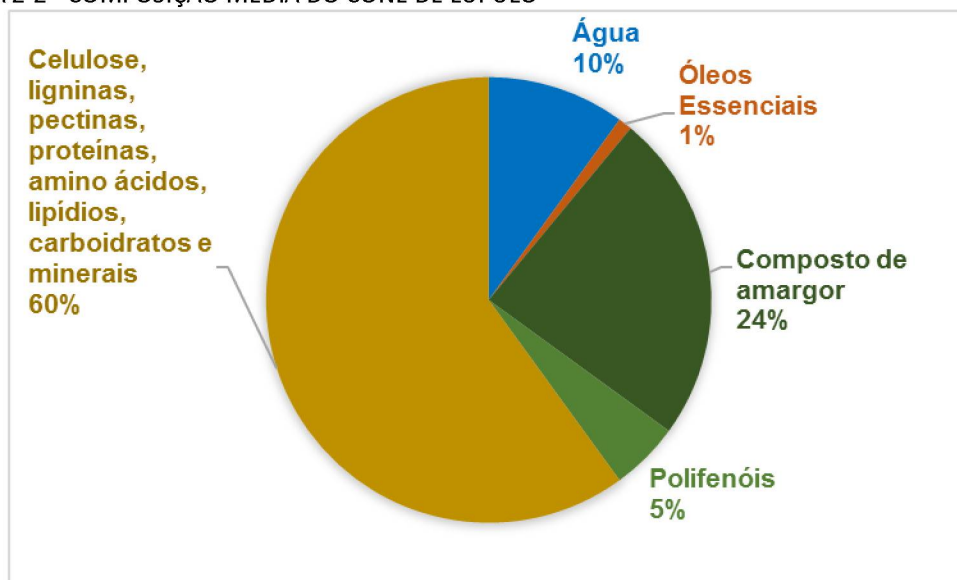
O lúpulo também era considerado uma planta com propriedades curativas, relatos de livros da idade média indicam o lúpulo como uma erva medicinal. O relato mais antigo é encontrado em um livro do século XI atribuído ao físico árabe Mesue, que descreve as propriedades anti-inflamatórias do lúpulo. Já no século XIII, o botânico árabe Ibn Al-Baylar enfatizou as propriedades calmantes da planta. Entre os anos de 1300 e 1600 muitos livros de ervas atribuíram ao lúpulo as mais variadas propriedades medicinais, tais como: diurético, antitérmico, agente anti-inflamatório para o ouvido, digestivo, entre outras aplicações (BIENDL, 2009).

Os relatos de aplicação medicinal se estendem até os tempos atuais, entretanto as primeiras pesquisas formais foram registradas ao final do século XIX e início do século XX. Essas pesquisas confirmaram as propriedades sedativas, atividade anti-inflamatória, de auxílio na cicatrização e como fonte de fitoestrógeno, um produto natural equivalente ao hormônio estrogênio (BIENDL, 2009). Dessa forma fica evidente a necessidade de se detalhar a composição do lúpulo.

2.2.1 Composição média do lúpulo

Cada variedade de lúpulo apresenta pequenas variações na sua composição química, porém existe uma composição média que é apresentada na FIGURA 2-2. Os mesmos compostos que conferem aroma e sabor, óleos essenciais, ou que são responsáveis pelo amargor, resinas, são os compostos bioativos do lúpulo.

FIGURA 2-2 - COMPOSIÇÃO MÉDIA DO CONE DE LÚPULO

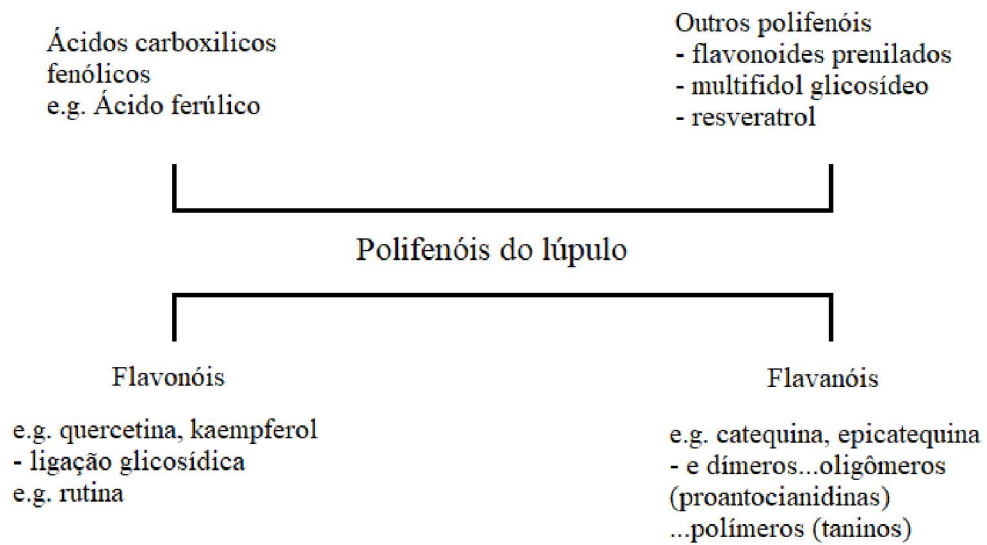


FONTE: MODIFICADO DE BIENDL, M., 2009

O lúpulo contém polifenóis que são classificados dentro do grupo de ácidos carboxílicos fenólicos (ácido ferúlico), flavonoides (quercetina e catequina) além de outros polifenóis que são destacados na FIGURA 2-3. Para os compostos de amargor, alguns polifenóis são encontrados especificamente no lúpulo como é o caso do

multifidol glicosídeo e os prenilflavonóides (xanthohumol, desmetilxanthohumol e 6- e 8- prenilnaringenina).

FIGURA 2-3 - POLIFENÓIS ENCONTRADOS NO LÚPULO



FONTE: MODIFICADO DE BIENDL, M., 2009

A TABELA 2-1 lista os compostos polifenólicos e quantifica sua concentração em lúpulos secos.

TABELA 2-1 - COMPOSTOS DE INTERESSE NO LÚPULO

Componente	Fração (%)
Totais	
Flavanóis	7
Prenilflavonóides	1,3
Flavonóis	0,5
Ácidos carboxílicos fenólicos	0,05
Individuais	
Xanthohumol	1,1
Co-multifidol glicosídeo	0,3
Catequina	0,2
Quercetina	0,2
Kaempferol	0,1
Desmetilxanthohumol	0,1
6-Prenilnaringenina	0,03
8- Prenilnaringenina	0,01
Ácido ferúlico	0,01
Reveratrol	<0,01

FONTE: Modificada de BIENDL, M., 2009

2.2.2 Composição média do óleo essencial do lúpulo

O óleo essencial do lúpulo representa em média 1% da massa do lúpulo em base úmida. Nessa fração são encontrados mais de 100 compostos voláteis, que são classificados como: ésteres, monoterpenos, monoterpenóides, sesquiterpenos e sesquiterpenóides. As principais substâncias que compõe a fração aromática do lúpulo são monoterpeno acíclico - β -mirceno (35,4%) e sesquiterpeno cíclico: β -cariofileno (8,3%) e α -humuleno (16,5%). Deve-se destacar ainda a grande concentração de sesquiterpeno acíclico - β -farneseno (14,5%). Os demais compostos com concentração

superior a 0,1% são listados na TABELA 2-2, que somados totalizam 99,4% da massa de óleo essencial (POŁEĆ et al., 2019).

TABELA 2-2 - COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LÚPULO - COMPOSTOS COM CONCENTRAÇÃO MAIOR QUE 0,1%

Número	Componente	Composição (%)
1	Ácido 3-metilbutírico	0,3
2	Ácido 2-metilbutírico	0,4
3	Butirato de isobutila	0,6
4	α -Pineno	0,6
5	Propionato de isopentila	0,6
6	6-metil-hept-5-en-2-ona	0,4
7	β -Pineno	0,4
8	Mirceno	35,4
9	2-Metilbutanoato de isobutila	0,6
10	Butirato de 3-metilbutila	3,3
11	Heptanoato de metila	0,4
12	Limoneno	0,5
13	β -Ocimeno	0,4
14	6-Metil-heptanoato de metila	0,4
15	Linalol	0,9
16	2-Metilbutanoato de 2-metilbutila	0,4
17	Pentil 3-metilbutirato	0,6
18	Octanoato de metila	0,2
19	2-Metilpropanoato de hexila	0,2
20	Nonanoato de metila	0,5
21	Geraniol	0,8
22	Undecan-2-ona	1,8
23	Metil (Z) -deca-4-noato	1,2
24	Geranato de metila	2,2
25	α -Ilangeno	0,5
26	α -Copaeno	0,7
27	E- β -Cariofileno	8,3
28	Trans- α -bergamoteno	1,5
29	E- β - Farneceno	14,5
30	α -Humuleno	16,5
31	γ -Muurolene	0,6
32	β -Selineno	0,6
33	α -Muurolene	1,4
34	(Z)- α -bisaboleno	0,9
35	δ -Cadineno	0,8

FONTE: Modificada de POŁEĆ, K. et al., 2019b

2.2.3 Alfa-ácidos e beta-ácidos do lúpulo

Os alfa-ácidos e beta-ácidos juntos, representam de 10 a 20% da massa do lúpulo seco. Eles também são chamados de ácidos de amargor pois os isômeros dos alfa-ácidos são os principais responsáveis pelo sabor amargo da cerveja. Os principais alfa-ácidos são cohumulona, humulona e adhumulona. Os beta-ácidos são caracterizados por apresentarem um radical prenila adicional no carbono seis quando comparado aos alfa-ácidos colupulona, lupulona e adlupulona (BOCQUET, Laetitia et al., 2018).

Os alfa-ácidos são encontrados nas glândulas de resina da flor da planta feminina de lúpulo. Esses compostos têm sido usados como agentes de amargor e como antimicrobianos na produção de cerveja durante séculos (BLAND et al., 2015; OLADOKUN et al., 2017).

Durante a fabricação da cerveja, principalmente na fervura, as altas temperaturas induzem a isomerização da estrutura ciclohexadienona do alfa-ácido à ciclopentadienona, resultando na formação dos iso-alfa-ácidos que são solúveis em água, aumentando sensivelmente a percepção de amargor no produto final. Estudos recentes mostram que o alfa-ácido não isomerizado, solubilizado na cerveja durante o processo de *dry hopping* (infusão de lúpulo a frio na cerveja), também contribui para o sabor da cerveja em sua forma oxidada, as humulinonas (ALGAZZALI; SHELLHAMMER, 2016; OLADOKUN et al., 2017). Os lúpulos são geralmente classificados de acordo com a concentração de alfa-ácidos que contêm. De maneira geral, o lúpulo de amargor contém de 5 a 10% alfa-ácidos, enquanto o lúpulo de aroma, normalmente apresenta concentrações de alfa-ácidos de até 5%. Alguns lúpulos de amargor também são ricos em compostos de sabor e aroma, sendo essas variedades denominadas como lúpulo de duplo propósito, pois podem ser usados para obtenção de amargor e também para adicionar aroma a cervejas (PALMER, 2006).

Tanto os alfa-ácidos, quanto o xanthohumol são os compostos mais estudados do lúpulo na atualidade. Isso devido suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e sedativas. Esses estudos associam os alfa-ácidos e o xanthohumol a efeitos benéficos à saúde, tais como a prevenção da osteoporose e combate a células cancerígenas (MACHADO et al., 2018; POLAK; BARTOSZEK; STANIMIROVA, 2013; VIEGAS et al., 2012).

2.2.4 Flavonoides e outros compostos de interesse do lúpulo

Além dos já citados compostos o lúpulo ainda é uma fonte de flavonoides, principalmente flavonóis e flavanóis. Os flavonóis apresentam forte atividade antioxidante, com destaque à quercetina que é encontrada na grande maioria das plantas e se faz presente no lúpulo. Esses compostos tem ação de neutralização de radicais livres, indiretamente prevenindo o câncer, o envelhecimento precoce e doenças degenerativas do sistema nervoso central, tais como Parkinson e Alzheimer. Os flavonóis e flavanóis também podem ser utilizados como agentes de redução de reações alérgicas (SEGAWA et al., 2007).

Os flavanóis encontrados no lúpulo apresentam cadeias longas e são capazes de combater um amplo espectro de bactérias, fazendo-se extremamente útil para o combate de infecções por bactérias ou até mesmo na prevenção de contaminação. Testes confirmaram a efetividade contra cárie e infecções com *H. pylori*, que causa úlceras intestinais e estomacais (SHINADA et al., 2007; YAHIRO et al., 2005).

O composto 8-prenilnaringenina, encontrado no lúpulo, é um potente fitoestrógeno, podendo ser utilizado como parte do tratamento de substituição de hormônio e *in vivo* conseguiu induzir a produção de células mamárias (OVERK et al., 2008). Dessa forma, os fitoestrógenos podem ajudar a prevenir doenças cardiovasculares e câncer. O ponto principal é o seu efeito de redução sobre os sintomas da menopausa. Podendo atuar também como agente de prevenção da osteoporose. A osteoporose é desencadeada por uma diminuição nos níveis de estrogênio endógeno, essa perda, que pode ocorrer naturalmente ao longo da vida. Esse composto pode ser reposto pelo consumo de fitoestrogênios, como 8-prenilnaringenina. A concentração desse fitoestrógeno no lúpulo é baixa; no entanto, pode ser isolado e concentrado para uso medicinal (BOWE et al., 2006; MILLIGAN et al., 2002; OVERK et al., 2008).

Tendo em vista a vasta gama de aplicações dos componentes do lúpulo, o cultivo no Brasil passou a ser interessante. Com o aumento da produção de variedades locais faz-se necessário um estudo da composição dessa matriz vegetal, que é extremamente sensível ao clima e às condições de cultivo.

2.3 ANTIOXIDANTES

Os processos oxidativos são a principal via de deterioração de vários produtos biologicamente importantes, resultando em mudanças nas propriedades como a qualidade sensorial, valor nutricional, funcionalidade e toxidez (ARAÚJO, Júlio Maria A., 2011). Além disso o estresse oxidativo, reações de oxidação nas células humanas, aumenta o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, câncer e envelhecimento precoce (HALLIWELL, 1995; MOREIRA et al., 2014).

Reações de oxidação são definidas como a perda de elétrons de um átomo ou grupo funcional, não sendo necessária a adição de átomos de oxigênio ou remoção de átomos de hidrogênio do composto oxidado. Radicais livres são moléculas instáveis e altamente reativas por possuírem elétrons desemparelhados. O processo de oxidação ocorre quando radicais livres, compostos com alta eletroafinidade, atacam suas vizinhanças. Quando atacadas essas substâncias cedem elétrons aos radicais livres, e acabam por se tornar um novo radical livre, desencadeando assim uma reação em cadeia, denominada estresse oxidativo. Os antioxidantes têm a capacidade de interromper ou prevenir essa reação em cadeia agindo como agente doador de elétrons para os radicais livres. Os antioxidantes ao cederem elétrons não se tornam novos radicais livres, dessa forma estabilizando o sistema (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Todo organismo vivo que se expõe a ambientes oxigenados, está susceptível ao estresse oxidativo. Se existe um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, ocorrerá a geração de radicais livres, diminuindo a capacidade do antioxidante em combatê-los. Essa situação induziu os organismos a desenvolverem sistemas de proteção à oxidação, os antioxidantes naturais (BARBOSA et al., 2010; DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; PISOSCHI; POP, 2015).

Os antioxidantes são um conjunto de substâncias formadas por vitaminas, minerais, pigmentos naturais e outros compostos vegetais que inibem o efeito dos radicais livres. Devido aos diversos mecanismos de inibição da oxidação, não existe uma definição única para os antioxidantes. Segundo descreve a ANVISA no Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, antioxidante é toda substância que retarda o

aparecimento da alteração oxidativa em alimentos (ANVISA-BRASIL, 1961). Porém, de maneira geral, os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em concentrações inferiores às do substrato oxidável, são capazes de inibir ou retardar o mecanismo de oxidação deste substrato, por meio de uma reação com os radicais livres ou pelo sequestro do oxigênio singlete (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010; HALLIWELL, 1995).

Com base em suas funções, os antioxidantes são classificados como: primários e sinergistas. Os antioxidantes primários atuam bloqueando a ação dos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio ou elétrons. Nesta classe estão os compostos fenólicos poliidroxilados (galatos) e os fenóis com impedimento estrutural como hidroxianisil butilato (BHA), hidroxitoleno butilato (BHT), di-t-butil-hidroquinona (TBHQ), que são sintéticos, e os tocoferóis, que são naturais. Os antioxidantes sinergistas são classificados genericamente como removedores de oxigênio e complexantes. Os removedores de oxigênio reagem com o oxigênio livre removendo-o de um sistema fechado, isto é, em situação na qual não exista novo contato com o oxigênio. O ácido ascórbico e seus derivados, ácido eritórbito e palmitato de ascorbila, pertencem ao grupo sinergista. Os agentes complexantes imobilizam íons metálicos, aumentando a energia de ativação das reações iniciais da oxidação. São exemplos deste grupo o ácido cítrico, fosfatos e EDTA (ARAÚJO, Júlio Maria A., 2011).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados em produtos alimentícios são o BHA, BHT, galato de propila (PG), TBHQ. Todos esses compostos atuam doando um próton ao radical livre interrompendo o mecanismo de oxidação. Entretanto, o uso destes antioxidantes é limitado devido a seu potencial de toxicidade à saúde humana (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015). Os antioxidantes BHA, TBHQ e PG apresentam potencial para formar complexos moleculares com estrutura do ácido nucleico induzindo a danos estruturais no DNA (DOLATABADI; KASHANIAN, 2010). Estudos *in vivo*, indicam que o uso de BHA e BHT em níveis elevados pode causar danos ao fígado e evoluir a câncer (BIPARVA; EHSANI; HADJMOHAMMADI, 2012). Dessa forma, o uso de antioxidantes naturais teve um aumento nos últimos anos, inclusive como uma demanda da indústria de alimentos e rações animais. Nesse âmbito os antioxidantes de extratos vegetais e a

sua potencial proteção contra várias doenças induzidas pelo estresse oxidativo tem sido explorado (HOU et al., 2003).

Os compostos fenólicos de origem natural são produtos secundários do metabolismo de vegetais e atuam como uma proteção natural da planta contra condições ambientais. São classificados como antioxidantes primários, devido ao seu papel como agentes redutores, doadores de hidrogênio e supressores de oxigênio singlete (BRAVO, 2009; EMBUSCADO, 2015). Eles podem ser encontrados em frutas, legumes, nozes, sementes, folhas, raízes e cascas (WANASUNDARA; AMAROWICZ; SHAHIDI, 1994).

Extratos vegetais e óleos essenciais têm sido reportados como fontes de compostos fenólicos com poder antioxidante comprovado (CAI et al., 2004; KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; SURVESWARAN et al., 2007; WOJDYŁO; OSZMIAŃSKI; CZEMERYŚ, 2007). Estudos sobre os extratos de alecrim e orégano indicaram a capacidade de inibição da oxidação pela estabilização de radicais livres (BHALE et al., 2007). O extrato de alecrim é capaz de estabilizar a oxidação lipídica em óleo de palma em processos de fritura (GUO et al., 2016). Extratos de alcaçuz foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante, sendo superiores aos extratos de alecrim (JIANG et al., 2013). Extratos de cúrcuma (PEZESHK; REZAEI; HOSSEINI, 2011), assim como extratos de manjerição, louro, salsa, zimbro, anis, erva-doce, cominho e gengibre, também tiveram sua eficácia como substâncias antioxidantes confirmadas (HINNEBURG; DAMIEN DORMAN; HILTUNEN, 2006).

A diversidade e concentração de fenólicos e a capacidade antioxidante de um extrato são alterados pelas condições de extração e pelo tipo de solvente utilizado em fontes vegetais secas (SULAIMAN et al., 2011). Devido a isso um estudo que compare a atividade antioxidante de extratos de lúpulo obtidos por diferentes métodos faz-se necessário.

2.4 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração é a principal etapa onde ocorre a obtenção de compostos e possibilita uma posterior identificação e utilização de compostos com alto valor biológico. Esses compostos podem ser obtidos de diferentes matrizes vegetais. Assim sendo a seleção da metodologia de extração a ser empregada depende da matriz, sendo fundamental para obtenção de um alto rendimento do extrato, combinada a uma alta concentração dos compostos de interesse (DANLAMI et al., 2014).

Métodos convencionais como a hidrodestilação e a extração por solventes orgânicos, são os mais utilizados pela simplicidade de aplicação. As técnicas mais utilizadas para a extração de óleos essenciais e extratos vegetais incluem Soxhlet, hidrodestilação e a maceração com álcool. Porém estes métodos apresentam inconveniências e limitações do processo que resultam em alteração da composição dos extratos podendo torna-los produtos de menor eficácia biológica. Normalmente esses processos necessitam de longo tempo de extração, altas temperaturas e grandes volumes de solventes, os quais geralmente apresentam toxicidade, e devem ser restringidos quando os extratos vegetais são utilizados em alimentos. Além disso, muitas vezes apresentam baixa seletividade, devido a degradação térmica de componentes termolábeis (DANLAMI et al., 2014).

As limitações dos processos convencionais, combinadas ao aumento da demanda de componentes bioativos de óleos essenciais e extratos vegetais, resultaram no desenvolvimento de novas tecnologias de extração, que visam contornar as desvantagens apresentadas pelos métodos convencionais. Dentre essas novas técnicas é possível destacar a extração com fluidos supercríticos e pressurizados.

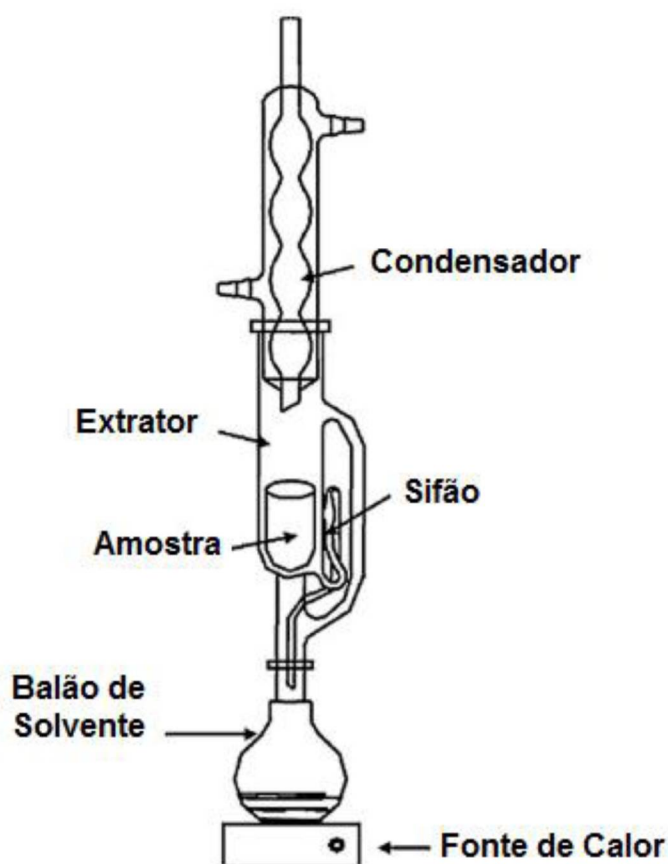
2.4.1 Extração por solventes orgânicos

A extração por solventes orgânicos é um dos métodos mais antigos utilizados em processos de separação. Esse processo é comumente empregado para a obtenção de extratos de grãos, oleaginosas, e tecidos biológicos, devido à sua natureza lipossolúvel (SAINI; KEUM, 2016). A separação dos compostos das matrizes acontece por

transferência de massa entre duas fases (sólido-líquido ou líquido-líquido) (RYDBERG, Jan et al., 2004; RYDBERG, M Cox; MUSIKAS; CHOPPIN, 2005). A extração por solventes de amostras sólidas, conhecida como “extração sólido-líquido”, consiste em manter o solvente em contato com a matriz vegetal por tempo suficiente para que ocorra a transferência dos constituintes solúveis presentes na planta. O próximo passo é a separação entre as fases sólida e líquida e para obtenção do extrato o solvente é evaporado. A matriz normalmente é triturada, esse processo além de aumentar a área de contato com o solvente, também promove o rompimento da parede celular, a qual é a principal resistência à transferência de massa. Consequentemente ocorre o favorecimento[OBJ:OBJ]. A técnica de extração por solventes orgânicos mais utilizada é por extrator Soxhlet, desenvolvida em 1879 por Von Soxhlet[OBJ:OBJ]. Um sistema convencional de Soxhlet, como mostrado FIGURA 2-4[OBJ], é basicamente composto por um extrator Soxhlet, acoplado a um balão contendo solvente, disposto sobre uma chapa de aquecimento. Dentro do extrator, a amostra sólida é colocada envolta por um material poroso. Com o aquecimento, o solvente entra em ebulição e o vapor gerado condensa no topo do extrator, que é mantido resfriado. Ao se condensar, o solvente precipita sobre a amostra e lentamente aumenta o nível de solvente no extrator. Ao atingir o nível do sifão, o solvente condensado retorna para o balão e arrasta consigo o material solubilizado no ciclo[OBJ:OBJ].

Os solventes mais utilizados são os hidrocarbonetos alifáticos (éter de petróleo e o n-hexano), álcoois (etanol e metanol), cetonas (acetona e metiletilcetona), ácido acético, acetato de etila, éter etílico e água (SIMÕES et al., 2007).

FIGURA 2-4 - SISTEMA DE EXTRAÇÃO POR SOLVENTES ORGÂNICOS (SOXHLET)



FONTE: MODIFICADO DE LUQUE DE CASTRO, M. D.; PRIEGO-CAPOTE, F., 2010

As principais vantagens dessa metodologia são as altas taxas de transferência de massa devido aos seguintes fatores:

- Contato entre solvente fresco e matriz, evitando a saturação do sistema;
- Temperatura relativamente alta, aumentando os coeficientes de transferência de massa;
- Não há necessidade de filtração após a lixiviação, reduzindo o custo de operação.

As principais desvantagens são:

- Longos períodos de extração;
- Necessidade utilização de grandes volumes de solvente;
- Uma etapa de evaporação de solvente é necessária para recuperação do solvente, demandando um alto consumo energético;

- Longo tempo de exposição a temperaturas elevadas, próximas do ponto de ebulição do solvente.

A última desvantagem é a mais importante, do ponto de vista dos compostos bioativos, pois existe a possibilidade de decomposição de compostos termolábeis devido ao longo tempo de exposição a temperaturas elevadas (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998). Devido a esses fatores a extração por solventes orgânicos não é indicada para obtenção de compostos bioativos.

2.4.2 Extração com fluidos pressurizados

A ampla competitividade no campo de produtos naturais, onde a qualidade, a disponibilidade e os preços são fatores primordiais, torna a eficiência das técnicas de extração/separação extremamente importantes. Assim, a extração por fluido pressurizado tem ganhado espaço por ser um processo onde se pode obter produtos de alta pureza e qualidade a partir de matrizes vegetais, principalmente devido a características como baixo fator de degradação, menor impacto ambiental e fácil separação do solvente (FORNARI, 2016; SILVA, Danielle C.M.N. et al., 2009). Estudos comparam rendimentos e composição para extrações utilizando propano pressurizado a extrações com scCO_2 . É possível observar uma variação considerável no rendimento e perfil de composição (WENCESLAU et al., 2021).

2.4.2.1 Extração com fluidos supercríticos

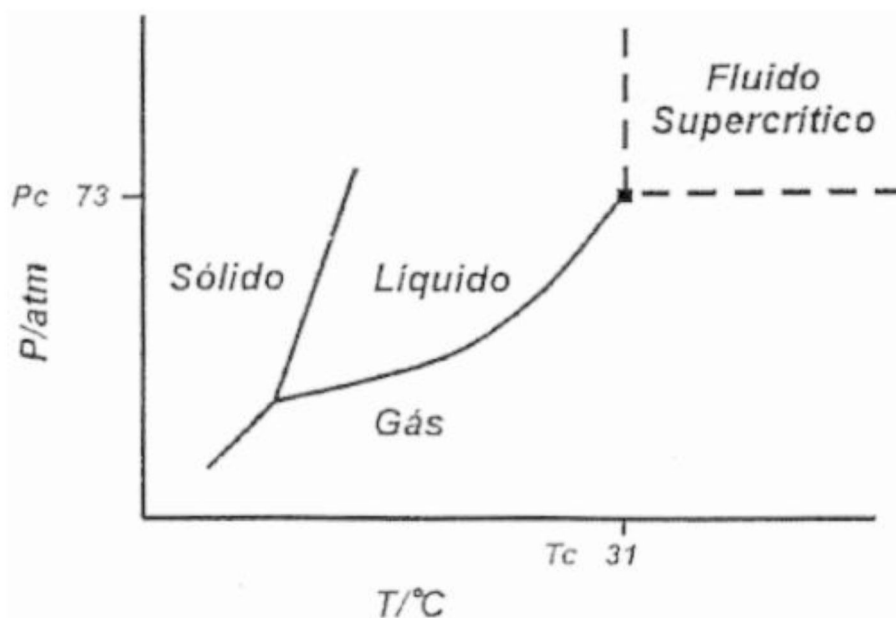
O processo de SFE é muito vantajoso e ambientalmente amigável em relação aos métodos de extração convencionais, o que o torna uma tecnologia promissora. No método SFE utiliza-se um fluido supercrítico como solvente, ou seja, fluidos em condições de temperatura e pressão acima de seus pontos críticos, aumentando o poder de solvatação do solvente. Dessa forma possibilitando a produção de extratos a partir de matrizes vegetais sólidas, como sementes, folhas e raízes.

Fluidos supercríticos têm uma maior difusividade e baixas densidade, viscosidade e tensão superficial, quando comparado a solventes orgânicos. Nas regiões

próximas ao ponto crítico o fluido tem densidade e difusividade similar à de líquido, porém viscosidade comparável à dos gases. Assim, apresenta bom poder de solvatação e alta difusividade (BRUNNER, 2005). Cada fluido apresenta um ponto crítico distinto, definido em termos de temperatura crítica e pressão crítica. O ponto crítico representa a maior temperatura e pressão em que a substância pode coexistir nas fases vapor e líquido em equilíbrio (KNEZ et al., 2014; SAHENA et al., 2009; SHARIF et al., 2014).

Como função da temperatura e pressão a que é submetida, uma substância pura pode existir nos estados gasoso, líquido, sólido ou supercrítico, como pode ser observado no diagrama de fases na FIGURA 2-5. As curvas representam as condições de temperatura e pressão onde duas fases coexistem em equilíbrio e, o ponto onde três fases coexistem, é chamado de ponto triplo. A curva onde gás e líquido estão em equilíbrio é definida como curva de vaporização, onde com o aumento da temperatura e pressão, o líquido torna-se menos denso, devido à expansão térmica, e o gás torna-se mais denso, devido ao aumento da pressão. Quando a curva de vaporização chega ao final, alcançando o ponto crítico, há a igualdade nas propriedades intrínsecas (por exemplo, densidade, viscosidade, índice de refração, condutividade térmica) das fases líquido e gás, e já não se pode mais distingui-los. Nessas condições definem-se a temperatura crítica (T_c) e a pressão crítica (P_c) de um fluido. A T_c é a temperatura acima da qual um fluido não pode ser liquefeito por compressão isotérmica, enquanto a P_c é a pressão acima da qual o gás não pode ser liquefeito por resfriamento isobárico (CARRILHO et al., 2001).

FIGURA 2-5 - DIAGRAMA DE FASES PRESSÃO EM FUNÇÃO DE TEMPERATURA PARA O CO₂



FONTE: CARRILHO, E. *et al.*, 2001

A SFE está baseada no poder de solvatação dos fluidos no seu estado supercrítico. Os fluidos supercríticos têm propriedades desejáveis que os tornam adequados para os processos de extração. As propriedades mais importantes são a sua densidade, viscosidade, difusividade, capacidade calorífica e a condutividade térmica. Altas densidades contribuem para maior poder de solvatação, enquanto que baixas viscosidades aumentam a sua difusividade. Manter a temperatura e pressão acima do ponto crítico de um fluido, aumenta sua capacidade em penetrar na matriz sólida e extrair moléculas alvo. Ao controlar-se a pressão do fluido supercrítico, sua solubilidade pode ser alterada, permitindo um elevado grau de seletividade (COELHO, José et al., 2020; PRONYK; MAZZA, 2009; PYO; KIM, 2014; VIGANÓ et al., 2016).

As principais vantagens da extração supercrítica em relação às técnicas convencionais de extração são a possibilidade do ajuste contínuo do poder de solvatação possibilitando a seletividade do solvente e a não utilização de solventes orgânicos poluentes, o que elimina a etapa de recuperação de solventes. Devido a isso, o emprego de fluidos supercríticos é considerado uma ótima opção para a extração e fracionamento de produtos naturais, em especial para as indústrias de alimentos e de fármacos (REVERCHON; DE MARCO, 2006).

Outras vantagens da extração supercrítica, podem ser destacadas:

- a) A extração pode ser realizada em temperaturas mais amenas que na extração convencional, possibilitando a extração de compostos naturais termicamente sensíveis;
- b) Os solventes utilizados são gasosos à pressão atmosférica e a temperatura ambiente, sendo assim facilmente separados dos extratos e recuperados;
- c) Os solventes recuperados podem ser reutilizados, podendo reduzir o custo operacional.
- d) A maioria dos gases supercríticos empregados são fisiologicamente seguros e inertes;
- e) A qualidade dos extratos é elevada, uma vez que estes não sofrem alterações térmicas, hidrólise, oxidação, esterificação ou caramelização, podendo representar com maior fidelidade o material original.
- f) O processo permite a adição de cossolventes, fazendo a extração diferencial de solutos não polares até solutos de alta polaridade e ainda aumenta a solubilidade do material a ser extraído;

Essas vantagens podem ser observadas nos trabalhos de MAUL, (1996) e CARDOZO *et al.*, (2007), o primeiro é uma revisão sobre a metodologia de SFE e o segundo um estudo sobre a aplicação da técnica de extração com CO₂ pressurizado para extração de alcaloides púricos a partir de folhas de *Ilex paraguariensis*. Esse tipo de extração além de possibilitar a extração de ácidos graxos, também apresenta boa seletividade para compostos antioxidantes e gera extratos com boa atividade antioxidante, mesmo em matrizes oleaginosas (SANTOS; DA SILVA; DA SILVA, 2020).

Como desvantagens da SFE podem ser citados o elevado custo do processo, em função dos equipamentos utilizados, e a baixa afinidade do CO₂ supercrítico com compostos muito polares. Este último ponto pode ser melhorado com o emprego de modificadores adequados, como solventes orgânicos de alta polaridade (CARDOZO, *et al.*, 2007; MAUL; WASICKY; BACCHI, 1996).

2.4.2.2 Modificadores de polaridade

Mesmo em altas densidades, o CO₂ tem capacidade limitada para solubilizar compostos de alta polaridade. A adição de modificadores pode melhorar a eficiência da extração aumentando a solubilidade de compostos na solução de solvente.

Normalmente a solubilidade do soluto no CO₂ supercrítico depende da presença de grupos funcionais na molécula, da massa molecular e da polaridade da mesma. Como o CO₂ é uma molécula com momento dipolo igual a zero, é uma substância apolar (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Desta forma, compostos orgânicos apolares ou levemente polares de baixa massa molecular são muito solúveis, os compostos polares e de maior massa molecular são moderadamente solúveis, enquanto os compostos altamente polares e de maior massa molecular, como açúcares, polissacarídeos, proteínas e taninos, são dificilmente solúveis em CO₂ supercrítico puro (BRUNNER, 2005). Para aumentar a solubilidade de compostos alvo polares e possibilitar a seletividade do processo de extração, tem sido proposto a adição de um solvente auxiliar ao CO₂, chamado de cossolvente ou modificador (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Estes são compostos polares que, adicionados em pequenas quantidades, podem induzir alterações substanciais das propriedades de solvência em relação ao CO₂ supercrítico puro (SOLANA et al., 2014).

A utilização de cossolventes é uma estratégia para aumento de rendimento dos extratos obtidos por SFE, devido ao aumento da polaridade do solvente. A água e o etanol são os cossolventes reconhecidos como seguros e amigáveis ao meio ambiente, sendo os mais indicados em processos de extração para aplicação em alimentos, devido à baixa toxicidade do etanol para o corpo humano (ASEP et al., 2013). O tipo de cossolvente a ser utilizado é determinado tendo em vista a afinidade química dos compostos alvo com o cossolvente. Portanto, a seleção dos cossolventes deve proporcionar o aumento das interações moleculares do solvente supercrítico com os compostos de interesse (PEREIRA; MEIRELES, 2010). Os cossolventes mais utilizados em processos de extração SFE são o metanol e o etanol, os quais são capazes de realizar interações do tipo dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio com moléculas do soluto contendo grupos polares (AZEVEDO et al., 2008; DA PORTO; DECORTI; NATOLINO, 2014; KOPCAK; MOHAMED, 2005).

Diversos estudos relatam o emprego de cossolventes como auxiliares no processo de extração com CO₂ supercrítico. No caso específico do lúpulo, um estudo realizado na China demonstrou que a utilização do etanol com modificador favoreceu a

extração de flavonoides de resíduo de lúpulo (HE et al., 2005). Entretanto, outros modificadores precisam ser testados e em diferentes condições de extração.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem vários artigos que estudam extratos do lúpulo obtidos por extração convencional e supercrítica, entretanto apenas um é focado em otimização de parâmetros e nenhum compara diferentes modificadores de polaridade. Também não foi encontrado na literatura a aplicação do acetato de etila como cossolvente para CXL de lúpulo, sendo esse um promissor solvente para compostos fenólicos quando combinado ao scCO_2 . Os rendimentos encontrados na literatura são baixos, em torno de 5%. As faixas de pressão são reduzidas e não ultrapassam os 12 MPa (HE et al., 2005; KUPSKI et al., 2017a; POŁEĆ et al., 2019). Analisando a situação atual faz-se necessário o estudo de técnicas de extração que utilizem fluidos pressurizados como o propano, além de testar diferentes cossolventes junto ao scCO_2 .

As extrações utilizando o scCO_2 e o propano pressurizado como solventes são as mais adequadas para a obtenção de extratos vegetais ricos em compostos bioativos, devido a uma combinação das condições de temperatura inferior a 80 °C, ausência de luz e oxigênio. Essas condições previnem a degradação térmica e a oxidação dos compostos termolábeis do extrato. Sendo assim essas metodologias de extração são mais adequadas para a produção de extratos de lúpulo, uma matriz vegetal rica em compostos fenólicos.

Como citado na introdução o Brasil é o oitavo maior importador de lúpulo do mundo, tendo importado 2421 toneladas em 2018 equivalentes a 1,63 % da produção mundial. Por outro lado, a produção nacional é de apenas 5 toneladas ao ano, o que é menos de 0,01 % da produção mundial de lúpulo.

O estudo da variedade brasileira de lúpulo, lúpulo Mantiqueira, pode fomentar o incremento na área de plantio e consequentemente induzir um aumento na produção de lúpulo nacional. Esse mercado cresce rapidamente no Brasil e no mundo podendo gerar impacto positivo na economia local.

CAPÍTULO 3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO COM FLUÍDOS PRESSURIZADOS, RENDIMENTOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, CONTEÚDO TOTAL DE FLAVONOIDES E COMPOSTOS FENÓLICOS

Esse capítulo apresenta a transcrição do primeiro artigo escrito e publicado durante a elaboração da presente tese. Nessa seção serão apresentados a matriz vegetal, tratamentos, os métodos de extração com fluídos pressurizados e supercríticos, além dos resultados de rendimento e composição dos extratos quanto a AA, TPC e TFC. Essa transcrição mantém o formato e linguagem original do artigo.

“COMPRESSED FLUIDS EXTRACTION METHODS, YIELDS, ANTIOXIDANT ACTIVITIES, TOTAL PHENOLICS AND FLAVONOIDS CONTENT FOR BRAZILIAN MANTIQUEIRA HOPS^a

The Journal of Supercritical Fluids (www.elsevier.com/locate/supflu)

Volume 170, April 2021, 105155.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105155>

Bruno Aguilar Veiga^a, Fabiane Hamerski^a, Mathias Porsmose Clausen^b, Massimiliano Errico^b, Agnes de Paula Scheer^a, Marcos Lúcio Corazza^{a,*}

^a *Department of Chemical Engineering, Federal University of Paraná, Francisco H. Santos Av. 100, 81531-990, Curitiba, PR, Brazil.*

^b *Department of Green Technology, University of Southern Denmark, Campusvej 55, 5230 Odense M, Denmark*

Abstract

This study compares the yields of different extractions methods for a Brazilian variety of *Humulus lupulus* using scCO₂, scCO₂+ethanol, scCO₂+ethyl acetate, and compressed propane. Extracts were characterized by total phenolics content (TPC), total flavonoid content (TFC), and antioxidant activity (AA). The extraction yields were from 2.7 to 10.1

* Artigo incluído na tese segundo as regras de direito autoral da Elsevier, conforme publicado em <https://www.elsevier.com/about/policies/copyright>

wt%, when using compressed propane at 20 °C and 10 MPa and scCO₂+ethyl acetate at 80 °C and 25 MPa, respectively. Furthermore, the effect of adding ethyl acetate as a cosolvent in a semi-batch process over the extraction time and extracts properties were evaluated in comparison to the extracts obtained using scCO₂, scCO₂+ethanol, and compressed propane. The results indicate that ethyl acetate increases the extraction yield and produces extracts with higher TPC, TFC, and AA values comparing to scCO₂+ethanol and similar values compared to pure scCO₂.

Keywords: *Humulus lupulus*; antioxidant activity; supercritical CO₂; compressed propane; cosolvent.

3.1 INTRODUCTION

Humulus lupulus is a dioic, perennial, herbaceous plant from the *Cannabaceae* family, native to Europe, West Asia, and North America. It is classified as a vine and can reach 6.1 m in height (PALMER, 2006). Only female plants produce the inflorescence known as hops, where the lupulin glands are found. Lupulin is rich in essential oils and resins. Essential oils are responsible for the aroma of the beer, and resin content provides bitterness. The bitter compounds are mainly alpha and beta acids, the most abundant components in the resin, and these acids become water-soluble after an isomerization reaction providing bitterness to the beers (LAFONTAINE et al., 2019; SCHÖNBERGER; KOSTELECKY, 2011).

Applications of hops as a medicinal plant date back to the 19th century (BIENDL, 2009). Researchers have confirmed hops as an anti-inflammatory (MAIETTI et al., 2017) and as a source of phytoestrogen (BOWE et al., 2006; CHADWIEK et al., 2004; MILLIGAN et al., 2002). *Humulus lupulus* flowers are used to relieve the symptoms of stress and insomnia (BIENDL, 2009) and as antifungal agents (BOCQUET, Laetitia et al., 2018). In vitro studies have shown that hops have anticarcinogenic and anti-fibrogenic activity in liver tissue (LEE et al., 2007; YASUKAWA et al., 1993). The essential oil obtained from hops is a mixture of more than 35 compounds, among them organic acids, alcohols, terpenes, esters, and phenolics (BIENDL, 2009).

Phenolic compounds are byproducts of plant metabolism, acting as natural protection against environmental conditions. These compounds are classified as primary antioxidants due to their role as reducing agents, hydrogen donors, and singlet oxygen suppressants (BRAVO, 2009; EMBUSCADO, 2015). Hops contain phenolic compounds that are classified as phenolic carboxylic acids (ferulic acid), flavonoids, and polyphenols. Among the polyphenols, resveratrol and xanthohumol are the most abundant prenylflavonoids (BIENDL, 2009).

Methods mostly used for obtaining oil-containing extracts from vegetable raw materials are the techniques involving solid-liquid extraction with organic solvents and steam distillation. Methods using organic solvents demand a separation step to

recover the solvent, and during the solvent distillation, a significant part of the volatile components can be removed from the final extract. The second mentioned method demands high temperatures, which can compromise the quality of the extract due to the degradation of the thermolabile compounds (PAVLIĆ et al., 2015). On the other side, supercritical fluid extraction (SFE) and the pressurized fluid extraction (PFE) are alternative techniques due to low temperature employed, high extraction rates, and in the first case, the separation of the solvent from the extract is facilitated due to the high volatility of the fluid at low-pressure conditions producing a solvent-free extract (NASCIMENTO et al., 2016; SAHENA et al., 2009). Compressed propane has also been proposed as a viable nonpolar solvent for lipids extraction from natural matters. Several studies with propane as a solvent in PFE have shown good extraction yields and high antioxidant activity for the final extracts obtained (CORREA et al., 2017, 2018; CZAIKOSKI et al., 2015; FETZER et al., 2018; GUEDES et al., 2018; KUPSKI et al., 2017b; LANZA et al., 2005; MESOMO et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2018).

The main limitation of SFE and PFE using pure supercritical carbon dioxide (scCO₂) and propane, respectively, concerns its low solvation capacity for polar compounds. However, the addition of polar modifiers (polar cosolvents) can overcome this limitation and thus contribute to increasing the overall extraction yield (PEREIRA; MEIRELES, 2010; SOLANA et al., 2014). In this sense, He et al. (HE et al., 2005) showed that the use of ethanol as a cosolvent favored the extraction of flavonoids from hop residues leading to an increase in flavonoid recovery from 0.5 to 7.6 mg/g at the optimal concentration of cosolvent, 80 % of ethanol to sample mass ratio. However, other modifiers should be tested to optimize the extraction of phenolics. Magalhães et al. (MAGALHÃES et al., 2007) tested five different solvents, and the methanol presented the highest recovery (92%) for xanthohumol, the most abundant prenylflavonoid present in the hops, followed by ethyl acetate with a recovery of 69%. Based on these previous studies, ethyl acetate as a cosolvent to the carbon dioxide for hop extraction seems to be a promising technique, mainly because it is a GRAS solvent with a low boiling point and it is capable of providing high extraction yields.

Another aspect that is worth mentioning is that repeated studies in the literature have used hop varieties cultivated in such traditional regions as the United

States, England, Czech Republic, and Belgium (EDWARDSON, 1952; MAGALHÃES et al., 2007; SANZ et al., 2019; VAN OPSTAELE et al., 2013). This study focuses on a new variety of hops developed and adapted to the climatic conditions in Brazil. This subspecies could generate extracts with distinct characteristics concerning other traditional hops from temperate regions. To the best of our knowledge, there are no reports in the literature combining the use of this new variety of hops locally produced with developing and promoting green technologies for the industry. Therefore, this work aimed to evaluate the extraction of hops using supercritical CO₂ (scCO₂), supercritical CO₂ + ethanol (scCO₂+EtOH), supercritical CO₂ + ethyl acetate (scCO₂+EtOAc), and compressed propane at different temperatures and pressures, and compare the extracts obtained from the extraction with compressed solvents to those obtained by Soxhlet extraction with different organic solvents. The extraction results were evaluated in terms of extraction yield, antioxidant capacity (AA), total phenolic compounds (TPC), and total flavonoid compounds (TFC).

3.2 MATERIAL AND METHODS

3.2.1 Samples

The vegetable matrix selected for this study was the flowers of *Humulus lupulus* Brazilian varietal, Brazilian hops (BH), which were purchased from a small hops grower cooperative in Brazil. This varietal is a mutation that was adapted to the Brazilian climate and originated from an American hop known as Cascade, which in turn is the result of the selective crossing with the Fuggle hop varietal from England. The samples were collected in Tuiuti (state of São Paulo – Brazil), located at an elevation of 790 m above the sea level, with monthly average precipitation of 140 mm and temperatures varying from 11 to 26 °C. The coordinates of the production field are latitude S 22°49'22.6" and longitude W 46°40'10.1". The hops were freeze-dried in a L101 Liobras (São Carlos, SP, Brazil) equipment for 30 hours under temperature and pressure conditions of -51 °C and 13.33 kPa, resulting in raw material with moisture and volatile compounds of 8.6 ± 0.5 g/100 g of freeze-dried hops. The samples named

freeze-dried Brazilian hops (FBH) were stored in polyethylene bags in a freezer at -18 °C until use.

3.2.2 Chemicals

Ethanol 95% purity, ethyl acetate 99.5% purity, methanol 99.9% purity, and n-hexane 99.5% purity, all purchased from Neon (Suzano, SP, Brazil) were used for extraction. For the supercritical and subcritical extractions, CO₂ 99.5% purity and propane 99.5% purity were purchased from White Martins (Araucaria, PR, Brazil). For the total phenolics content, total flavonoids content and antioxidant activity analysis: DPPH - (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), Trolox - (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) standard, gallic acid standard, catechin hydrate standard, and Folin-Ciocalteu phenol reagent 2 N all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Sodium Carbonate Merck, (Darmstadt, HE, Germany) and Methanol HPLC grade Panreac (Barcelona, CT, Spain).

3.2.3 Determination of moisture, volatile compounds, and density

The moisture and volatile compounds were determined by weight loss upon drying, where the samples were oven-dried at 105 °C until they reached the constant weight, and the moisture was calculated by dividing the mass loss by the initial mass of the sample.

The real density of the dried raw material was determined by an automatic helium pycnometer Ultrapyc 1200e Quantachrome (Boynton Beach, FL, USA) at the Analytical Centre of the Institute of Chemistry at Unicamp, Campinas, Brazil.

3.2.4 Soxhlet extractions

Soxhlet extraction with different solvents was used as a benchmark extraction for reference and comparison purposes. All extractions were performed in triplicate at the boiling temperature of the solvent at atmospheric pressure for 8 h using 5 g of FBH

and 180 mL of solvent. The solvents used individually for each extraction were: ethanol, ethyl acetate, methanol, and n-hexane. The samples were rotary evaporated (RV 10 Digital IKA, Staufen, BW, Germany) at vacuum conditions. After that, the extracts were dried using an air circulation oven at 60 °C until they reached a constant weight. Equation 3.1 was used to calculate the extraction yields.

$$Yield(\%) = \frac{Mass\ of\ extract}{Mass\ of\ matrix} \cdot 100\%$$

[3.1]

3.2.5 Extraction with compressed fluids

In this work, the compressed fluid extraction methods were divided into three groups to evaluate the influence of different approaches when applied to hops: (i) extractions using supercritical CO₂ (scCO₂), (ii) compressed propane, and (iii) using CO₂ plus liquid solvents, consisting of scCO₂ with ethanol and ethyl acetate liquid solvents. All these extraction experiments were performed in a semi-batch approach.

The extraction equipment utilized in this study has been presented and described in previous studies (ARAÚJO, Micheli Nolasco et al., 2019; COELHO, Renata et al., 2016; TREVISANI JUCHEN et al., 2019). The laboratory-scale extractor setup consists of a high-pressure jacketed-vessel, a 62.4 cm³ stainless steel extraction vessel, with 19 mm diameter and 220 mm bed height, coupled to a heat circulation bath, and a syringe pump (500D ISCO, Lincoln, NE, USA) coupled to a circulation bath set to 10 °C for all extractions performed in this study. The solvent flow, during the dynamic extraction, was controlled by modulating two valves, a needle valve, and a micrometer valve couple to the exit extraction vessel stream. The samples were collected in a separation flask, where the compressed fluid is separated from the sample mixture at atmospheric pressure and temperature, due to the high vapor pressure of the compressed solvent. Sensors and transducers were used to measure the temperature and pressure inside the extractor.

To evaluate the influence of two main variables, temperature, and pressure, on the overall extraction yield, a 2² factorial design with triplicate determinations at

the central point was carried for each system. The variables studied ranged from 40 to 80 °C and 15 to 25 MPa for scCO₂ and scCO₂+ethanol (or ethyl acetate), and 20 to 60 °C and 3 to 10 MPa for compressed propane extractions. The extraction yield from each experimental condition was calculated according to equation 3.1.

3.2.5.1 Supercritical fluid extraction (SFE) and pressurized fluid extraction (PFE)

Around 10 g of FBH was packed inside the extractor vessel and the temperature was set to extraction temperature. The pressurized fluid was pumped to the extractor until the system reached the extraction pressure set point. The matrix and the solvent were kept in contact for 60 min without flow, i.e., in a static extraction period to thermal and mechanical equilibration.

The solvent flow was then adjusted until a continuous flow of 2.0 ± 0.4 cm³/min of solvent, measured at the syringe pump conditions. At this point, the dynamic extraction step started. In this setup, the solute-solvent mixture is depressurized through a heated micrometer valve until it reaches the atmospheric temperature and pressure in the separation flask. The mass of extract was collected in test tubes at predetermined times and used to calculate the overall extraction yield curves, according to the procedure reported by Correa et al. (CORREA et al., 2016). The total extraction time depends on each extraction procedure, and they will be listed along with extraction conditions in the results discussion.

3.2.5.2 Supercritical CO₂ + cosolvent extractions

In this study, ethanol and ethyl acetate were used as a cosolvent with scCO₂, both acting as polarity modifiers. Ethyl acetate was used at a cosolvent to FBH mass ratio (MR) of 1:1 and 2:1. The organic solvent (ethyl acetate or ethanol) was added to the raw material inside the extractor vessel before the compressed solvent was pumped. The best three conditions of extraction using scCO₂ + EtOAc were compared to extractions using scCO₂ + EtOH, as the ethanol is the most frequent cosolvent used

in SFE applied to the food industry, including hop extractions (FORNARI, 2016; SANZ et al., 2019).

For these extraction procedures, approximately 10 g of FBH was packed inside the extractor bed at the extraction temperature. Then the cosolvent was added to the solid inside the vessel to reach the predetermined MR. Thus, pressurized CO₂ was injected using the syringe pump until the extractor reached the pressure of the extraction. This condition was kept for 30 min to thermal and mechanical equilibration, and to assure the liquid phase becomes homogeneous. As previously mentioned, this step is named static extraction period. After the static extraction, the dynamic extraction took place and the extracts were collected following the same procedure described in section 2.5.1.

An additional step for the organic solvent separation from the extract was performed in these experiments. The cosolvent (ethanol or ethyl acetate) was evaporated from the extract in an air circulating oven at 40 ± 2 °C for 30 h.

3.2.6 Total phenolics content, total flavonoids content, and antioxidant activity

3.2.6.1 Preparation of samples

All samples were prepared and analyzed in triplicate. Extracts from hops using pressurized fluids extraction methods were weighed, approximately 50 mg of each sample, and then 10 mL of methanol was added before the analysis. This mixture was vigorously shaken for 5 min and centrifuged for 10 min at 1010 g and 25 °C. The methanol phase was used to determine the total phenolic content, total flavonoid content, as well as antioxidant activity by spectrophotometric methods described below. All analyses were conducted using a UV-VIS spectrophotometer GTA 97 Global Analyzer (Monte Alto, SP, Brazil).

3.2.6.2 Total phenolic content by Folin-Ciocalteu reagent

Total phenolic content (TPC) was determined by the Folin-Ciocalteu reagent method and was performed according to the procedure described by Singleton et al. (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999) with some modifications. Firstly, the methanol sample solution, prepared as previously described, was diluted to a final concentration of 0.7 mg mL^{-1} . To determine the TPC, 0.2 mL of the last sample solution and methanol to complete the volume up to 0.5 mL, was mixed with 2.5 mL of Folin-Ciocalteu reagent (diluted 1:10 in distilled water). The mixture was kept in the darkness for 3 min. Afterward, 2 mL of sodium carbonate 7.5 % was added, and the mixture was incubated in the dark for two hours. Then, the solution absorbance was measured at 760 nm. The quantitative results were calculated using an analytical curve of gallic acid and were expressed as mg of Gallic acid equivalents (GAE) per 1 g of sample (mg GAE.g^{-1}).

3.2.6.3 Total flavonoid content

The total flavonoid content (TFC) of samples was determined based on the method proposed by Zhishen et al. (ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING, 1999), with some modifications. The aliquots ranging from 0.1 to 0.3 mL of samples were top-up with methanol reaches 0.4 mL of volume, then 1.6 mL of distilled water and 0.12 mL of NaNO_2 (5% w/v) were added to amber bottles and mixed. After 5 min, 0.12 mL of AlCl_3 (10% w/v) was added; and after 6 min, 0.8 mL of NaOH (1 mol L^{-1}) and 0.96 mL of distilled water were added. The solution absorbance was measured at 510 nm after 5 min. Catechin was used as the standard for a calibration curve, and the results were expressed as mg of catechin equivalent (CE) per 1 g of sample (mg CE.g^{-1}).

3.2.6.4 Radical scavenging activity by DPPH• assay

The antioxidant activity (AA) was determined by the DPPH• assay performed based on the method described by Brand-Williams et al. (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER;

BERSET, 1995). A 3.9 mL aliquot of a 6×10^{-5} mol L⁻¹ DPPH• methanolic solution was mixed with 100 µL of diluted samples. The DPPH• absorbance was monitored at 515 nm after one hour. The quantification was performed using a Trolox analytical curve, and the results were expressed as mmol of Trolox equivalents antioxidant capacity (TEAC) per 1 g of sample (mmol TEAC.g⁻¹).

3.2.7 Statistical analysis

Results were analyzed using analysis of variance (ANOVA) at a confidence level of 95 % using the software Statistica 10 (Statsoft Inc., USA), and to plot the pareto chart of standardized effects to evaluate the statistical significance of two main variables, temperature, and pressure. The ANOVA and pareto charts for each solvent are finding in the supplementary data.

3.3 RESULTS AND DISCUSSION

3.3.1 Vegetable matrix and samples

Vegetable matrix (FBH) used in all extraction experiments performed in this study presented a moisture content (after freeze-drying) and real density of 8.6 ± 0.5 wt% and 0.96 ± 0.01 g/cm³, respectively. The extraction yields in Soxhlet extraction with organic solvents are presented in Table 3-1. The results indicate an increase in yield by increasing the polarity of the solvent. The highest extraction yield was observed for ethanol and methanol, around 25.8 wt% for both solvents, followed by the ethyl acetate (around 11.4 wt%) and n-hexane (around 6.7 wt%). Results presented in Table 3-1 are also showing that this vegetable matrix presents a higher amount of extractable compounds in polar solvents, using short-chain alcohols and a short-chain ester (ethyl acetate), which is a food-grade compound. Therefore, based on results presented in Table 3-1, it can be seen that the ethyl acetate (EtOAc) is a promising volatile short-chain ester to be used as cosolvent and polarity modifier for hop

extractions driven by supercritical CO₂ conditions, even presenting an overall extraction yield almost half of the values found for short-chain alcohols.

Another important aspect related to the results presented in Table 3-1 is the extraction with n-hexane, a nonpolar solvent. Besides this solvent promoted the lowest extraction yield, compared to the other three polar solvents, even so, it provided an important recovery of extracts from the hops raw material investigated. In this sense, the extractions with compressed propane, which is a compressed nonpolar solvent, were performed and its extracts were compared to the extractions with scCO₂. These results were presented and discussed later.

TABLE 3-1 - EXTRACTION YIELDS OF FBH EXTRACTION BY DIFFERENT ORGANIC SOLVENTS

Experiments	Solvent	Polarity Index ^b	Yield (wt%) ^c
S1	Ethanol	5.2	25.8 ± 0.9
S2	n-Hexane	0.0	6.7 ± 0.2
S3	Ethyl acetate	4.3	11.4 ± 0.6
S4	Methanol	6.6	25.8 ± 0.7

SOURCE: THE AUTHOR, 2020.

To evaluate the influence of using different solvents and compare the results with a polarity modifier-assisted extraction, extractions with pure scCO₂ (SFE), scCO₂ + EtOH, and scCO₂ + EtOAc and compressed propane (PFE) were also performed. As mentioned, the fixed bed for all extractions contained approximately 10 g of FBH. Table 3-2 presents the overall extraction yields, calculated at the end of the semi-batch extraction process (after static extraction, plus dynamic extraction and bed depressurization steps). For SFE, PFE, scCO₂ + EtOAc extractions with MR of 1:1 and 2:1, the same factorial design with two factors and two levels and a triplicate at the central point was utilized. The SFE showed overall extraction yields ranging from 4.7 to 7.6 wt%. Kupski et al. (KUPSKI et al., 2017b) reported similar yields between 1.2 and 7.1 %, even using a different variety of hops, Hallertau Mittelfrüh, in pellet form.

Lower overall extraction yields were observed for the extraction using scCO₂ and compressed propane. Comparing the best yield condition of scCO₂ and

^bRef. (GUEDES et al., 2020)

^cExtraction yield expressed in wt% (mean ± standard deviation) based on triplicate experiments

compressed propane, the extraction yields were around 7.6 and 6.0 wt%, respectively, and it can be seen that the extraction yield obtained with scCO₂ was 27 % higher than the value obtained with propane. Extractions with compressed propane reached similar values of Soxhlet extraction with n-hexane, indicating that the compressed propane could be used as an alternative and selective solvent for the extraction of nonpolar compounds.

Also, Table 3-2 presents the results for the extractions using scCO₂ + polar solvents. It can be seen that both cosolvents ethyl acetate and ethanol, presented a positive effect over the overall extraction yield. EtOAc and EtOH in 2:1 MR improved the extraction yield by 34 and 39 %, respectively, when compared to the extraction results obtained using scCO₂. The pressurized extraction techniques provided extraction efficiency of over 80 % for at least one set of pressure and temperature of each experimental design tested (solvent type and approach used) comparing to the Soxhlet extraction (see Table 3-2).

Each extraction method was evaluated independently by analysis of variance (ANOVA). First, SFE using just scCO₂ as the solvent, where the most relevant factor was the pressure, with a positive effect, i.e., the increase in the pressure of extraction leads to an increase in the overall extraction yield. The temperature only presented a positive effect when combined with the pressure.

A significant model fit for the SFE yield was confirmed by ANOVA, $R^2 = 0.98$, and $R^2_{adj} = 0.96$. The $F_{Calculated}$ (47.22) was greater than $F_{Tabulated}$ (9.28) from Fisher's distribution table with $\alpha = 0.05$, degree of freedom for regression = 3, and degree of freedom for residue = 3.

For PFE with compressed propane, a positive effect of temperature and a negative effect of pressure on the extraction yield was observed, and the combination of the two independent variables resulted in an increase in the extraction yield. Only the effect from temperature was statistically significant.

A significant model fit for FBH extraction yields using PFE was confirmed by ANOVA, $R^2 = 0.95$, and $R^2_{adj} = 0.91$. The $F_{Calculated}$ (20.35) was greater than $F_{Tabulated}$ (9.28) from Fisher's distribution table with $\alpha = 0.05$, degree of freedom for regression = 3, and degree of freedom for residue = 3.

For the extraction yield of FBH using scCO_2 + EtOAc at different EtOAc to solids mass ratio (MR), temperature and pressure presented a positive effect over the extraction yield for both EtOAc to solids mass ratio. On the other hand, the interaction between the two factors (TxP) was significantly positive at 2:1 MR, and a marginal negative effect at 1:1 MR.

For all cases, except by PFE, the overall extraction yield was increased by increasing the temperature and pressure. For compressed propane, only the temperature presented a positive effect on the extraction yield, since increasing the pressure, in a subcritical state at a constant temperature, propane in the liquid state has its diffusion into the matrix compromised by the increase in its density and viscosity.

TABLE 3-2 - OVERALL EXTRACTION YIELDS OF FBH USING SFE, PFE, SCCO₂+COSOLVENT

Run	Extraction Method	T (°C)	P (MPa)	MR ^d	Extraction time (min)	Extraction Yield (wt%)	Extraction efficiency (%) ^e	S/F ^f	Total solvent (g) ^g
1	SFE (scCO ₂)	40	15	-	110	5.6	82	8.24	251.00
2		40	25		110	6.0	89	6.27	228.60
3		80	15		110	4.7	70	4.42	248.54
4		80	25		110	7.6	113	5.58	214.80
5, 6, 7		60	20		110	6.2 ± 0.1	92	6.11 ± 0.13	205.48 ± 16.11
8	PFE (Propane)	20	3	-	70	3.9	58	4.72	110.79
9		20	10		70	2.7	40	5.23	118.03
10		60	3		70	5.8	87	4.71	153.81
11		60	10		70	6.0	90	4.48	109.96
12, 13, 14		40	6.5		70	4.2 ± 0.2	63	4.46 ± 0.18	107.33 ± 6.01
15	(scCO ₂ + EtOAc)	40	15	2:1	60	9.6	84	8.50	167.41
16		40	25	2:1	60	7.8	68	8.51	177.39
17		80	15	2:1	60	7.7	68	12.39	161.50
18		80	25	2:1	60	10.2	89	6.04	106.81
19, 20, 21		60	20	2:1	60	8.3 ± 0.2	73	6.08 ± 0.86	125.61 ± 2.13
22		40	15	1:1	60	5.6	49	6.73	188.48
23		40	25	1:1	60	7.1	63	7.08	180.86
24		80	15	1:1	60	6.8	60	4.33	154.14
25		80	25	1:1	60	7.6	67	5.93	171.14
26, 27, 28		60	20	1:1	60	8.1 ± 0.2	71	5.85 ± 0.22	171.26 ± 11.37
29		40	15	2:1	30	9.4	36	8.41	122.66

^dMass Ratio = Mass of cosolvent (g) / mass of FBH (g) at the initial time of dynamic extraction (t = 0 min)

^eExtraction efficiency = Yield of pressurized extraction / yield of Soxhlet extraction. SFE and PFE were compared to n-hexane, scCO₂ + EtOAc was compared to EtOAc, and scCO₂ + EtOH compared to EtOH

^fSolvent to feed ratio (wt/wt), i.e. Mass of solvent injected into the bed before the static extraction (g) / mass of FBH at initial time of static extraction (g). For SFE and ScCO₂+cosolvent the solvent is scCO₂ and for PFE the solvent is propane.

^gTotal solvent consumed during the extraction. i.e. Mass of solvent injected into the bed before the static extraction + solvent consumed during the dynamic extraction. For SFE and ScCO₂+cosolvent the solvent is scCO₂ and for PFE the solvent is propane.

30	(scCO ₂ +	80	25	2:1	30	10.5	41	7.98	108.73
31	EtOH)	60	20	2:1	30	8.7	34	6.72	106.69

2 SOURCE: THE AUTHOR, 2022.

Two main reasons for the temperature effect over the overall extraction yield performance in an isobaric process are the density of the solvent and the vapor pressure of the solute. As increasing the temperature increases the vapor pressure, an increase in the solute solubility in the solvent occurs. On the other hand, increasing the temperature, the density of the solvent decreases reducing the solvation capacity (CARERI et al., 2001). Due to this effect, extractions at high temperature and high pressure resulted in higher overall yields.

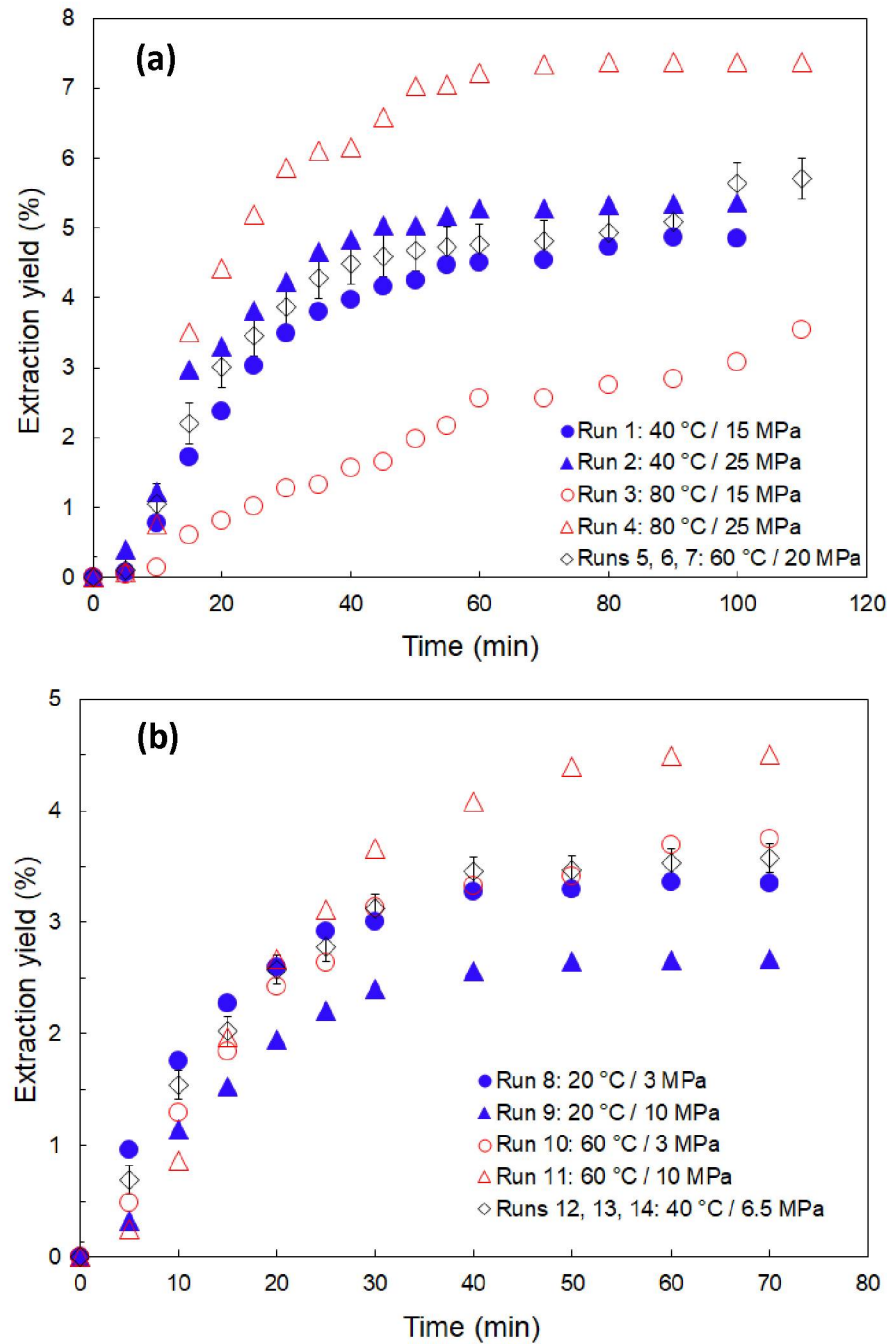
The results presented in this study have shown that the application of cosolvent improves the extraction yield by increasing the solubility of polar compounds present in the hops matrix, but it can be a factor in decreasing the selectivity of the extraction (HERRERO; CIFUENTES; IBANEZ, 2006).

3.3.1.1 Overall extraction curves

FIGURE 3-1 depicts the overall extraction curves for extraction using scCO₂ and propane. It can be observed that the highest initial extraction rate and highest extraction yield for the SFE were obtained at the highest temperature and pressure levels (Run 4) investigated in this work (80 °C, 25 MPa), followed by other conditions at 40 °C and then at the central point. All these SFE curves presented the three extraction periods, named constant extraction rate (CER), falling extraction rate (FER), and diffusion-controlled period (DCP). These results observed for hop extractions, FIGURE 3-1(a), are indicating that the density of the supercritical fluid is the main parameter driving the extraction. The temperature of the process is an important factor that is increasing the vapor pressure of solutes, the diffusivity of CO₂, and increasing the solubility of compounds in dense scCO₂ medium leading to initial high extraction rates.

For the extractions using compressed propane as the solvent, the initial extraction rates were similar, indicating that the solubility of hop compounds in compressed propane is, possibly, invariant within the range of temperature and pressure investigated. However, the overall extraction yield is significant increased with the increase in the temperature, as already discussed.

FIGURE 3-1 - OVERALL EXTRACTION CURVES OF FBH USING (A) SCCO₂, AND (B) PROPANE AS THE SOLVENT.

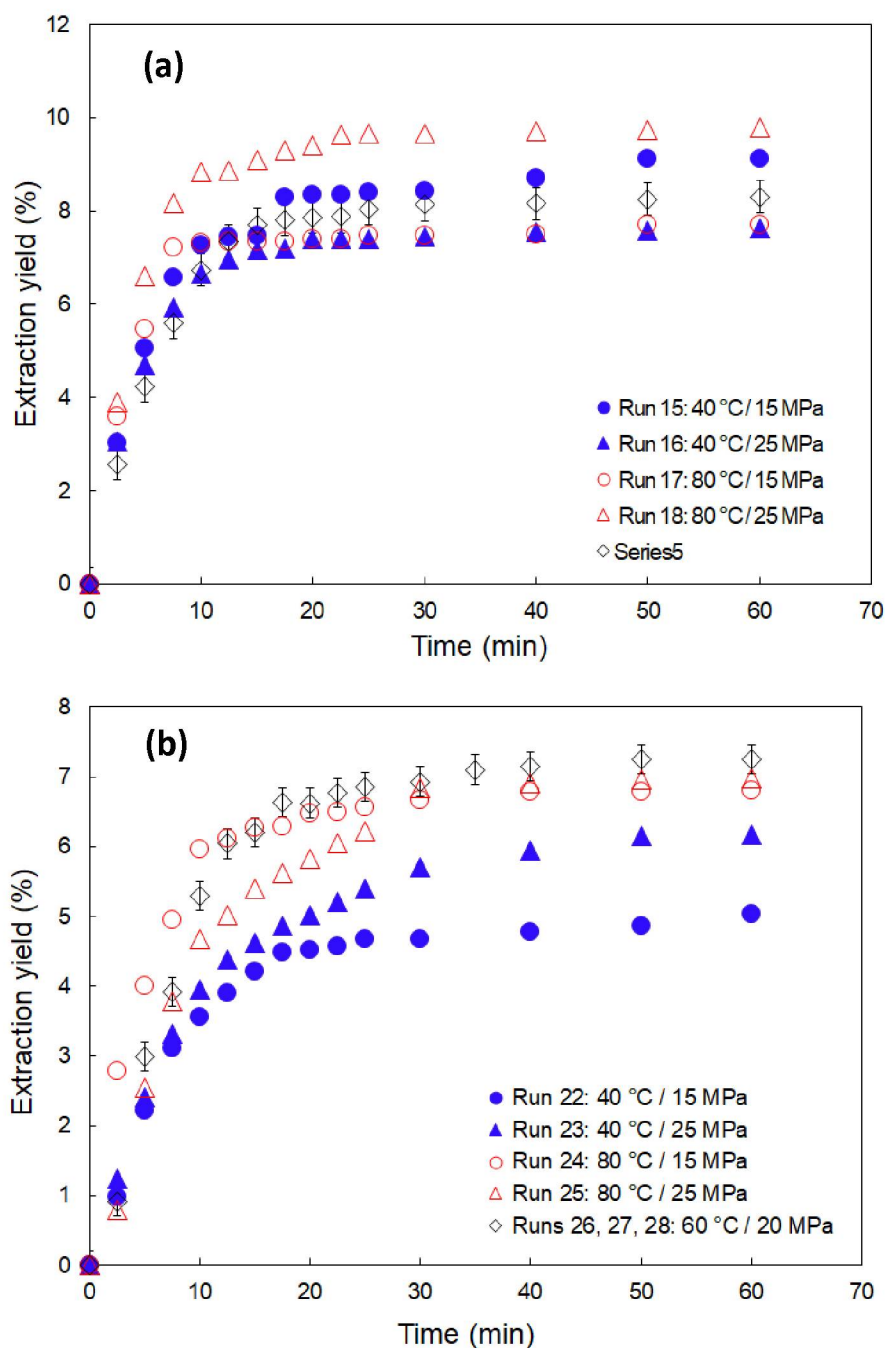


SOURCE: THE AUTHOR, 2022.

FIGURE 3-2 presents the overall extraction curves for extraction using scCO₂ + EtOAc. As presented in FIGURE 3-2(a), for the extraction with ethyl acetate (EtOAc) to FBH mass ratio of 2:1 the highest extraction rates were obtained at 80 °C and 15 MPa (Run 17) and 25 MPa. However, even presenting similar initial extraction rates,

the condition at 80 °C and 25 MPa (Run 18) presented a final higher extraction yield when compared to 15 MPa. At 40 °C, an opposite effect of pressure is observed, increasing the pressure from 15 MPa to 25 MPa the initial extraction rates were almost the same but decreased the yield of the extraction at the end of the process. It is possible to see a strong correlation between the temperature and the initial extraction rate and mainly on the overall extraction yield. If the extraction is conducted at constant pressure, both the solubility and diffusivity are improved by increasing the temperature, making the static extraction more effective (MESOMO et al., 2012). It is worth mentioning that for the results in FIGURE 3-2(a), all extraction conditions presented a constant extraction rate until 15 min, approximately, and then jumped to a diffusion-controlled period. FIGURE 3-2(b) presents the extraction curves for conditions with EtOAc to FBH mass ratio of 1:1 (MR), and it can be seen that differently of extractions at 2:1, this condition at lower cosolvent related to the biomass, presented the usual three steps extraction, i.e., after a constant extraction rate (CER) period, the process went through a falling extraction rate (FER) and then a diffusive controlled period (DCP). The transition between CER and FER occurred around minute 10, and the transition to DCP around minute 25. For the results presented in FIGURE 3-2(b), the highest initial extraction rate was observed at 80 °C and 15 MPa (Run 24). Nevertheless, after 17.5 min, the condition at the central point (60 °C and 20 MPa) provided higher extraction yields. It is indicating that a lower initial amount of liquid solvent (ethyl acetate) the density of CO₂ has an important role in the kinetics of this extraction, and the same extraction performance is obtained for extraction at 80 °C and 15 MPa (or 25 MPa) and 60 °C and 20 MPa.

FIGURE 3-2 - OVERALL EXTRACTION CURVES FOR SCCO₂ + ETOAC AT DIFFERENT ETOAC TO SOLIDS MASS RATIO: (A) 2:1 AND (B) 1:1

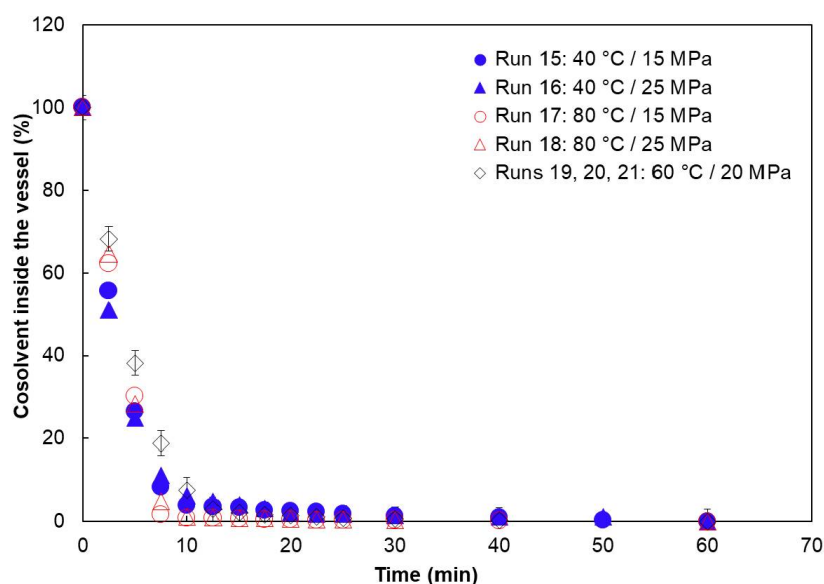


SOURCE: THE AUTHOR, 2022.

From the results presented in FIGURE 3-2(a), it was observed that after 15 min of extraction the cosolvent was totally carried by the CO₂ from the extraction vessel and then, after this point, the extraction was performed only with CO₂ being fresh pumped into the extractor. FIGURE 3-3 is showing the ethyl acetate profile inside the extractor during different extraction conditions with scCO₂+EtOAc of temperature and

pressure and a solvent to solids mass ratio of 2:1, where after an extraction time around 20 min the liquid solvent is totally removed from the extraction vessel. It was also visually observed the absence of liquid solvent collected in the flasks during the extraction sampling that after this time around 15 to 20 min, depending on the extraction conditions (FIGURE 3-3). Therefore, it can be seen that in this semi-batch extraction approach, when the cosolvent is removed from the extraction vessel the extraction is set back to a pure CO₂ extraction condition, which means that this type of extraction could be stopped at 10 to 15 min of extraction. Thus, the results presented in this work are showing that it is possible to perform the extraction of hops using scCO₂ plus ethyl acetate as cosolvent obtaining higher extraction yields in shorter times of process, comparing to the extraction with pure scCO₂.

FIGURE 3-3 - ETHYL ACETATE (WT%) REMAINING INSIDE THE EXTRACTOR VESSEL (CALCULATED BY MASS BALANCE) IN SEMI-BATCH SCCO₂+ETHYL ACETATE EXTRACTIONS AT COSOLVENT TO SOLIDS MASS RATIO (MR) OF 2:1



SOURCE: THE AUTHOR, 2022.

3.3.2 Total phenolic content, total flavonoid content, and antioxidant activity

The results for the assays of TPC, TFC, and AA are presented in Table 3-3. All extracts obtained from FBH presented considerable TPC values varying between 87 mg

GAE.g⁻¹ and 189 mg GAE.g⁻¹. These values are 20 times higher than previous studies with grape using similar techniques (DA PORTO; DECORTI; NATOLINO, 2014; NATOLINO et al., 2016). These high values can be a combination of different factors like the pretreatment (freeze-drying) of the raw material, storage conditions, maturation stage, and growing conditions, in addition to differences between extraction conditions.

The highest value of TPC was found in the extract obtained by SFE with CO₂. All extracts of this group of extraction presented high TPC with values comprehended in the range 175 – 189 mg GAE.g⁻¹. The extract with the maximum TPC was obtained at 80 °C and 25 MPa (Run 4). Even in higher temperature extractions, the phenolic compounds are preserved.

The TPC values of the FBH extracts obtained by PFE with propane as a solvent were independent of extraction conditions. These extracts showed similar TPC, comprehended between 123 and 138 mg GAE.g⁻¹, and although these values are promising, they are lower than the extracts obtained by SFE and SFE + EtOAc.

Ethyl acetate, combined with scCO₂, was shown to be an excellent solvent for phenolic compounds. All extracts obtained using scCO₂ + EtOAc presented high TPC values, comprehended between 150 and 181 mg GAE.g⁻¹. Temperature and pressure conditions did not present significant differences in the outcome of the TPC at 1:1 MR. However, there is a negative effect of temperature over the TPC obtained using scCO₂ + EtOAc at 2:1 MR. Thus, a tendency to a higher concentration of phenolics in extracts obtained at lower temperatures was observed, indicating a possible thermal degradation of the phenolic compounds in this case.

Extracts obtained by scCO₂ + EtOH presented similar values for TPC in the range between 87 and 91 mg GAE.g⁻¹, presenting the lowest results for TPC comparing with results obtained using ethyl acetate as cosolvent. This result was not expected considering the polarity of ethanol and, consequently, the affinity with phenolic compounds compared to ethyl acetate. However, the use of ethanol in scCO₂ extractions may favor the extraction of other compounds from the hops matrix, such as carbohydrates, reducing the concentration of phenolics in the final extract. Due to this lack of selectivity, the TPC suffer dilution in these extracts (Table 3-2). When

comparing the overall yields of exhaustive extractions (Table 3-1), in which the yield with ethanol was 2.3 times higher than that of ethyl acetate, it is indicating that each solvent extracted different classes and fractions of compounds.

The analysis of TFC presented the tendency of an increase in values for lower temperatures of extraction using scCO_2 . For the PFE, the increase of temperature induces a significantly reduction of TFC as well, and the increase of pressure enhanced consistently the extraction of flavonoids. The FBH extracts with the highest TFC were obtained using only scCO_2 , followed by the extracts obtained using $\text{scCO}_2 + \text{EtOAc}$ that presents similar values independently of conditions of extraction (temperature or pressure) for 2:1 MR. Meanwhile, the effects of temperature and pressure are negative and positive, respectively, for the extracts obtained using $\text{scCO}_2 + \text{EtOAc}$ at 1:1 MR. TFC values for extracts of these two methods are ranged from 60 up to 93 mg CE.g^{-1} and 51 up to 70 mg CE.g^{-1} , respectively.

Once more, the ethyl acetate as a cosolvent produces a richer in flavonoids extract when compared to the ethanol as a cosolvent. However, in opposition to the TPC results, the extracts obtained by $\text{scCO}_2 + \text{EtOH}$ presented higher TFC (35 – 42 mg CE.g^{-1}) than extracts obtained by PFE (18 – 30 mg CE.g^{-1}), ratifying the higher affinity of ethanol by different flavonoids.

All extracts have high antioxidant activity values even when compared to several different matrices (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011), the values ranging from 0.60 to 1.53 mmol TEAC.g^{-1} corroborating all the TPC and TFC analysis. For all solvents a negative effect of temperature over the AA was observed. The extracts with the highest values for antioxidant capacity were obtained by scCO_2 extractions, followed by $\text{scCO}_2 + \text{EtOAc}$. This result was expected considering the values of TPC and TFC. Moreover, hops are a source of phenolics compounds derived from benzoic and cinnamic acid, in addition to flavonoids that can retard or prevent oxidation acting as radical scavengers.

TABLE 3-3 - TOTAL PHENOLIC CONTENT, TOTAL FLAVONOID CONTENT, AND ANTIOXIDANT ACTIVITY BY DPPH*

Run	Extraction Method	T (°C)	P (MPa)	MR ^c	TPC (mg GAE.g ⁻¹)			TFC (mg CE.g ⁻¹)			DPPH* (mmol TEAC.g ⁻¹)		
1	SFE (CO ₂)	40	15	-	185	±	9	93	±	4	1.53	±	0.02
2		40	25		176	±	10	90	±	5	1.46	±	0.04
3		80	15		175	±	8	64	±	1	1.31	±	0.04
4		80	25		189	±	4	91	±	2	1.35	±	0.02
5, 6, 7		60	20		180	±	13	60	±	8	1.27	±	0.03
8	PFE (Propane)	20	3	-	128	±	2	25	±	2	1.15	±	0.03
9		20	10		128	±	7	30	±	0	1.10	±	0.06
10		60	3		131	±	4	18	±	1	0.95	±	0.03
11		60	10		138	±	4	21	±	1	1.05	±	0.04
12, 13, 14		40	6,5		123	±	5	23	±	1	1.02	±	0.08
15	scCO ₂ + EtOAc	40	15	2:1	181	±	2	57	±	3	1.27	±	0.03
16		40	25	2:1	162	±	8	52	±	8	1.17	±	0.02
17		80	15	2:1	150	±	16	58	±	4	1.12	±	0.03
18		80	25	2:1	156	±	8	51	±	3	1.14	±	0.03
19, 20, 21		60	20	2:1	167	±	20	65	±	9	1.27	±	0.03
22		40	15	1:1	174	±	9	61	±	3	1.32	±	0.04
23		40	25	1:1	169	±	21	70	±	4	1.27	±	0.01
24		80	15	1:1	164	±	3	56	±	1	1.18	±	0.04
25		80	25	1:1	176	±	5	59	±	9	1.14	±	0.04
26, 27, 28		60	20	1:1	176	±	5	59	±	1	1.23	±	0.05
29	scCO ₂ + EtOH	40	15	2:1	87	±	6	42	±	2	0.62	±	0.01
30		80	25	2:1	91	±	9	35	±	1	0.60	±	0.03
31		60	20	2:1	89	±	3	39	±	2	0.13	±	0.04

SOURCE: THE AUTHOR, 2022.

^cMass Ratio = Mass of cosolvent (g) / mass of FBH (g) at the start of the extraction.

Conditions presented as Run 4, the best global yield for SFE, presented the best TPC and the second-best TFC. This same trend can be observed in Runs 25 and 30. Thus, it is possible to notice that the increase in yield does not compromise the quality of the extracts obtained from the FBH, within the conditions evaluated in this study.

3.4 CONCLUSIONS

In this work, different non-conventional extractions were used to obtain extracts of hops (*Humulus lupulus*) Mantiqueira variety; the addition of ethyl acetate enhanced the extraction of global yield, rate, and efficiency. The best and second-best extractions were achieved using scCO₂ + Ethanol 2:1 RM and scCO₂ + EtOAc 2:1 RM at the same conditions 80 °C and 25 MPa, with global yields of 10.52 and 10.14 wt% respectively. Its results were indicating that in general terms, temperature and pressure combined have a positive effect on the extraction yield.

The results of TPC and TFC indicate that the use of EtOAc as a cosolvent does not reduce the quality of the extracts as antioxidant agents. The FBH extracts obtained using scCO₂ + EtOAc presented similar TPC when compared to pure scCO₂ extraction. Ethanol as cosolvent enhanced the overall extraction yield but presented a significant reduction in the selectivity for phenolic compounds. All the extracts presented a high antioxidant activity, expected effect due to the high concentrations of phenolic compounds found in the extracts from hops.

This study demonstrated that ethyl acetate is a promising cosolvent in scCO₂ extractions, due to increased yield and phenolic compound extraction in various plant matrices. It is also possible to conclude that hops produced in Brazil are a rich source of bioactive compounds, even those produced under different climate conditions.

Brazilian hop extracts obtained by the extraction techniques presented in this work have great potential for use in the pharmaceutical and food industry, and a more detailed study of the composition of the extracts is suggested.

Abbreviations

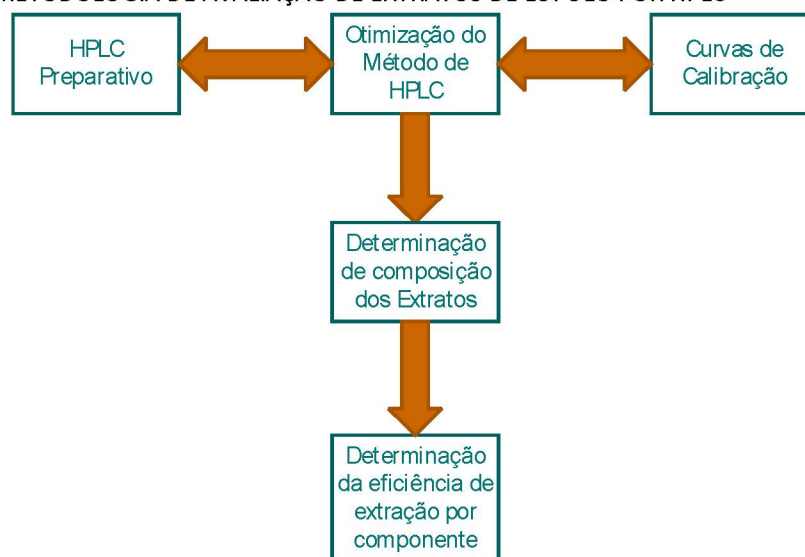
AA	Antioxidant activity
ANOVA	Analysis of variance
BH	Brazilian hops
CE	Catechin equivalent
CER	Constant extraction rate
DCP	Diffusive controlled period
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EtOAc	Ethyl acetate (Ethyl ethanoate)
EtOH	Ethanol
FBH	Freeze-dried Brazilian hops
FER	Falling extraction rate
GAE	Gallic acid equivalent
MR	The ratio of cosolvent mass to Freeze-dried Brazilian hops mass at start of extraction ($g_{\text{cosolvent}}/g_{\text{FBH}}$)
PFE	Pressurized fluid extraction
scCO ₂	Supercritical carbon dioxide
SFE	Supercritical fluid extraction
TEAC	Trolox equivalents antioxidant capacity
TFC	Total flavonoids content
TPC	Total phenolics content
UV-VIS	Ultraviolet-Visible"

CAPÍTULO 4 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Para o estudo da composição do lúpulo brasileiro e seus extratos, todos os experimentos foram realizados nas instalações do laboratório do Departamento de Engenharia Química, Biotecnologia e Tecnologia Ambiental da Universidade do Sul da Dinamarca. Os extratos concentrados de lúpulo (International Calibration Extract 3 – ICE-3) utilizados na preparação dos padrões foram fornecidos pela Labor Veritas de Zurique, Suíça.

A metodologia utilizada para o desenvolvimento do presente trabalho de doutorado foi organizada na forma de fluxograma e é apresentada na FIGURA 4-1:

FIGURA 4-1 - METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DE EXTRATOS DE LÚPULO POR HPLC



FONTE: O AUTOR, 2022.

Uma metodologia de HPLC foi desenvolvida e otimizada para avaliar os extratos contendo adhumulona, humulona, cohumulona, adlupulona, lupulona, colupulona e xanthohumol. Esse método deve conseguir quantificar os sete compostos em uma única injeção visando otimizar o processo e reduzir tempo de análise.

Uma vez definido o método foi então necessário separar e purificar os compostos a partir do extrato concentrado padrão (ICE-3), utilizando HPLC preparativa. Foram realizados múltiplos estágios de purificação para se obter uma massa significativa de cada um dos compostos a serem quantificados, para posteriormente serem utilizados

para construção de curvas de calibração do método cromatográfico. Assim foi possível realizar a quantificação dos compostos nas amostras dos extratos e da própria matriz vegetal.

Com as composições de amostras provenientes dos diferentes extratos e também do lúpulo liofilizado, foi possível calcular a eficiência de extração de cada solvente a diferentes condições de temperatura e pressão.

4.1 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE HPLC E OTIMIZAÇÃO

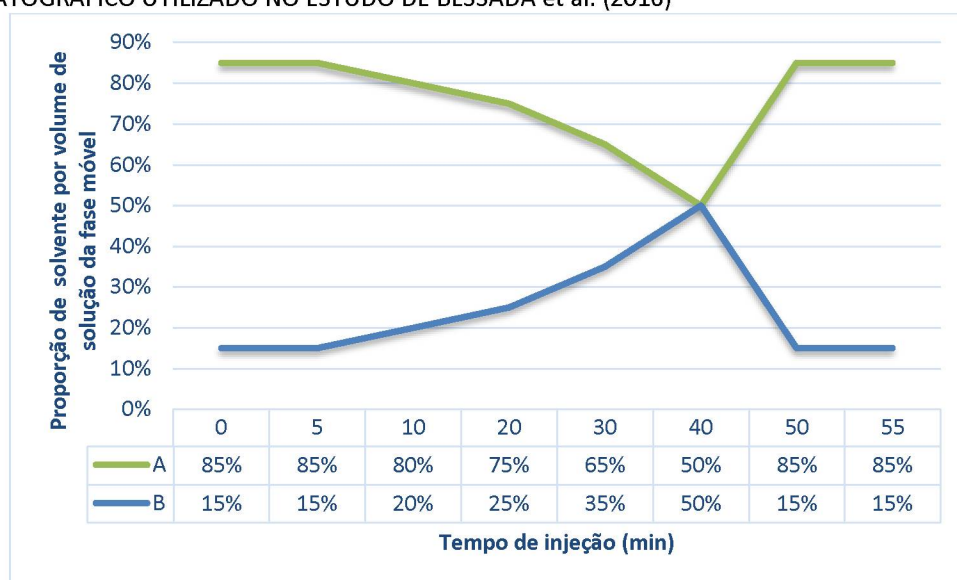
A cromatografia líquida de alta performance, HPLC sigla em inglês, é uma metodologia muito eficiente para identificação e quantificação de compostos químicos. Essa aplicação é ainda mais importante em extratos naturais que normalmente apresentam dezenas e até centenas de diferentes componentes. À medida que o número de componente da mistura aumenta, aumenta também a complexidade de análise por HPLC. Visando o aumento da eficácia do método é importante alcançar uma boa separação física entre os compostos analisados, possibilitando assim a quantificação de cada um destes através de curvas de calibração (ALLEN; OTT, 2012).

Várias são as estratégias de otimização de métodos cromatográficos. Os principais parâmetros para desenvolvimento e otimização destes métodos cromatográficos serão listados a seguir. A coluna utilizada no equipamento é escolhida baseando-se na natureza e polaridade dos compostos presentes na amostra a ser analisada. Após selecionada a coluna cromatográfica mais adequada ao sistema, os solventes precisam ser escolhidos adequadamente. A eluição é fortemente alinhada com a força do solvente, onde a força dos solventes está intimamente ligada a polaridade dos mesmos. Na cromatografia de fase reversa, a fase estacionária (coluna) é composta por material não polar e solventes menos polares terão maior poder de eluição. Dessa forma os solventes mais polares serão considerados solventes fracos, pois levarão mais tempo para solubilizar os compostos retidos na fase estacionária. A escolha dos solventes deve levar em conta, principalmente a polaridade dos analitos, pois é a principal característica que definirá a afinidade, das espécies. Compostos polares apresentarão menores tempos de retenção, na coluna, quando utilizados solventes de

maior polaridade, devido a maior interação do composto com a coluna. A eluição pode ser isocrática, onde apenas um solvente ou uma mistura de solventes com composição constante é utilizada durante toda a injeção, ou pode ser gradiente, nesse caso a composição do solvente varia ao longo do tempo, gerando assim um gradiente de polaridade. A eluição gradiente é usada para redução dos tempos de retenção quando comparada a eluição isocrática. Outra vantagem da variação da composição da fase móvel é a formação de picos mais bem definidos e finos, além de redução no tempo de equilíbrio do sistema. Depois de definida a fase fixa e móvel, parâmetros como temperatura da coluna, vazão da fase móvel, volume de amostra injetada e pH da amostra podem ser utilizados para aumentar a resolução dos picos e otimizar o tempo de retenção e consequentemente o tempo total de análise (HARRIS, 2010).

O estudo realizado por BESSADA, (2016), que quantificou compostos fenólicos em *COLEOSTEPHUS myconis*, desenvolveu um método analítico baseado em HPLC adequado para mircetina, quercetina e seus derivados. Entretanto, quando aplicado para os ácidos alfa e beta do lúpulo, os tempos de retenção encontrados, foram muito maiores (BESSADA et al., 2016). Então esse estudo foi utilizado como ponto de partida no desenvolvimento do método utilizado nesse trabalho. O método consiste em uma eluição não isocrática utilizando como solventes: solução aquosa de ácido fórmico a 0.1% (A) e acetonitrila (B). O gradiente utilizado na eluição, em uma coluna S3 ODS-2C18, foi de 5 min isocrático com 15% de B, uma rampa de 5 min de 15 a 20% de B, de 20 a 25% de B em 10 min, 25 – 35% de B em 10 min, 35 – 50% de B em 10 min, seguido por uma rampa para reequilibrar a coluna. A vazão de fase móvel foi de 0,5 mL/min durante toda a injeção. Os comprimentos de onda utilizados no sensor de absorção de espectro foram 280, 320 e 370 nm, obtidos em um espectrômetro de massa acoplado ao sistema de HPLC. O perfil de composição da fase móvel ao longo do tempo pode ser observado na FIGURA 4-2.

FIGURA 4-2 - CURVA DE COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL AO LONGO DO TEMPO DE INJEÇÃO NO MÉTODO CROMATOGRÁFICO UTILIZADO NO ESTUDO DE BESSADA et al. (2016)

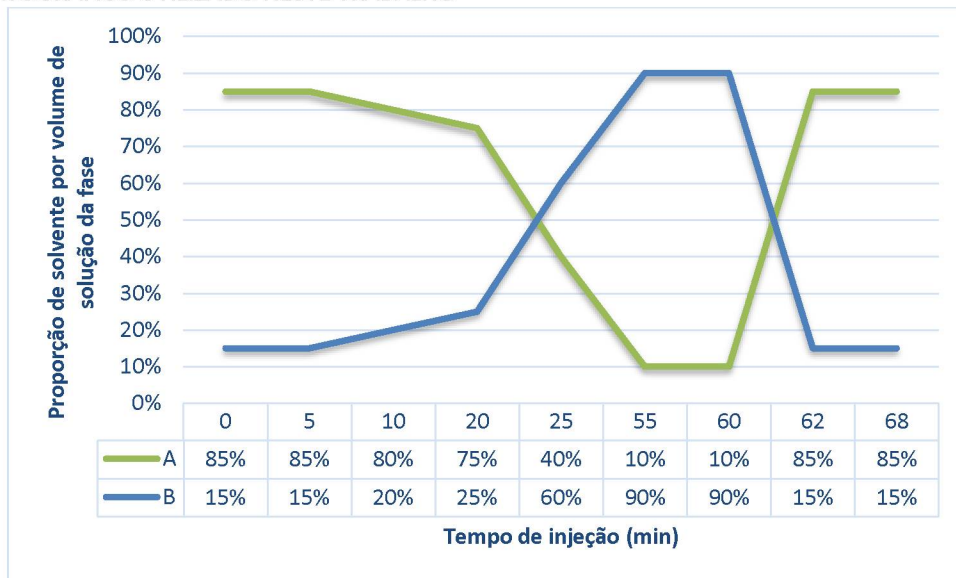


FONTE: ADAPTADO DE BESSADA et al., 2016.

Para o desenvolvimento e otimização do método cromatográfico utilizado nesse trabalho, foi utilizado um cromatógrafo de alta performance em fase líquida, HP 1200 series, Agilent Technologies Aps, Nærum, Denmark. Equipado com detector de matriz de fotodiodos para detecção UV em comprimentos de 205, 340 e 370 nm. A fase estacionária utilizada foi uma coluna C18 (Gemini 5 μ C18 110A, 250×4,6 mm i.d., Phenomenex Aps, Værløse, Dinamarca) operada a 35 °C. Após testes preliminares o volume de injeção de amostra e vazão de fase móvel foram fixados em 10 μ L e 0.8 mL/min respectivamente. As amostras foram solubilizadas em solução metanólica (75%), ácido fórmico (1%) e água (24%) em bases mássicas.

Essa metodologia de preparo das amostras foi adaptada de forma a evitar a necessidade de novas diluições das amostras durante as injeções no cromatógrafo. O método proposto por Bessada foi adaptado e após ajustes em tempos e composições da fase móvel apresentou picos de boa resolução e possibilitaram a identificação dos principais compostos do extrato de lúpulo. A FIGURA 4-3 apresenta a curva de gradientes final.

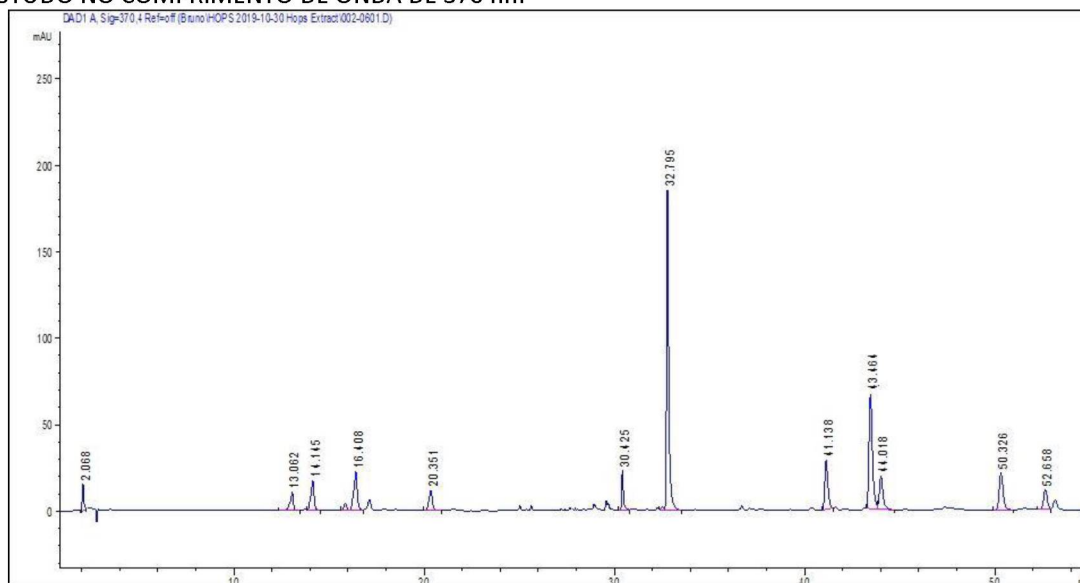
FIGURA 4-3 - CURVA DE COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL AO LONGO DO TEMPO DE INJEÇÃO NO MÉTODO CROMATOGRÁFICO UTILIZADO NESTE TRABALHO



FONTE: O AUTOR, 2022.

Utilizando essa metodologia os tempos de retenção encontrados para os principais compostos foram: Xanthohumol (32 min), Cohumulona (41 min), Humulona (43 min), Adhumulona (44 min), Lupulona (50 min), Colupulona (52 min) e Adlupulona (53 min). A FIGURA 4-4 apresenta um cromatograma típico do extrato de lúpulo brasileiro utilizando o canal de leitura UV em 370 nm.

FIGURA 4-4 - CROMATOGRAMA TÍPICO OBTIDO PELO MÉTODO CROMATOGRÁFICO APLICADO NESSE ESTUDO NO COMPRIMENTO DE ONDA DE 370 nm



FONTE: O AUTOR, 2022.

Esse método de cromatografia de alta performance em fase líquida conforme apresentado após sua otimização, permitiu identificar e quantificar os sete principais compostos do lúpulo com boa resolução e separação entre os picos havendo apenas uma pequena sobreposição entre a adlupulona e colupulona devido à similaridade entre as estruturas. A presença dessa última parte não comprometeu a quantificação dos beta ácidos. A quantificação desses sete compostos foi possível devido a utilização de curvas de calibração para cada um dos componentes.

Extratos utilizados como padrão para quantificação normalmente apresentam uma mistura desses componentes. Assim sendo optou-se pela purificação e separação de cada um desses compostos via cromatografia preparativa em fase líquida. Dessa forma extratos concentrados de lúpulo Mantiqueira foram preparados e posteriormente separados. A técnica utilizada será melhor descrita na próxima sessão.

4.2 CROMATOGRAFIA PREPARATIVA

A cromatografia preparativa é uma ferramenta amplamente empregada para isolar e purificar compostos químicos de interesse. Essa técnica utiliza equipamentos mais robustos e com dimensões muito maiores que a cromatografia líquida de alta performance. Devido a isso é possível obter quantidades significativamente maiores de material de interesse (MCCHESNEY; RODENBURG, 2014). O material purificado pode ser utilizado em futuras avaliações na cromatografia em fase líquida. Para separar os compostos xanthohumol, humulona, lupulona e suas respectivas variações foi utilizado um sistema semi-preparativo de cromatografia líquida da Dionex Ultimate 3000 Binary,

produzido pelo Thermo Fisher Scientific, equipado com detector de arranjo de diodos (PDA). O sistema preparativo foi equipado com uma unidade coletora Foxy Jr. Fornecido pela Teledyne ISCO Inc. A fase estacionária utilizada foi uma coluna de cromatografia em fase líquida da Develosil™ ODS-HG (250 x 20 mm, diâmetro de partícula de 5 µm).

De maneira análoga, foram utilizadas as mesmas duas soluções solventes do método cromatográfico descrito no tópico anterior. O método foi adaptado para o equipamento preparativo e gerou os mesmos picos. O gradiente e perfil de injeção de solventes foi o mesmo na cromatografia preparativa e analítica. As amostras foram divididas em 9 frações. Todas as frações foram analisadas, posteriormente, por HPLC visando estimar a pureza de cada uma dessas frações.

As frações foram divididas de acordo com os tempos de retenção dos principais picos conforme é possível observar na TABELA 4-1. Os tempos de eluição foram distintos devido a diferença entre o leito e dimensões dos equipamentos. Foram realizadas sucessivas injeções, as frações foram concentradas e geraram as massas dispostas na TABELA 4-1.

TABELA 4-1 - TEMPOS DE RETENÇÃO PARA OS PRINCIPAIS COMPOSTOS DO LÚPULO MANTIQUEIRA

Fração	Tempo de Retenção		Composto	Massa de padrão (mg)
	Preparativa	Analítica		
1	0-18	1-10		
2	18	30	Rutina	40
3	22	32	Xanthohumol	128
4	38	41	Cohumulona	104
5	42	43	Humulona	196
6	44	44	Adhumulona	104
7	55	50	Lupulona	148
8	59	52	Colupulona	111
9	61	53	Adlupulona	77

FONTE: O AUTOR, 2022.

Essas massas foram suficientes para produzir curvas de calibração para os sete compostos listados nas frações 3 a 9. Para a construção dessas curvas a pureza de cada uma das espécies foi aferida individualmente e variaram de 60,6 a 93,1 %, valores

superiores aos encontrados no ICE-3 da American Society of Brewing Chemists (AHA, 2010). A pureza foi medida utilizando a metodologia de HPLC analítica já descrita.

4.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Antes da injeção das amostras para elaboração das curvas de calibração as massas obtidas pela HPLC preparativa, foram solubilizadas em solução de metanol, a 75 %, e ácido fórmico, a 1 % (relações mássicas em água). Essa solução foi utilizada em todos os processos de extração e diluição, as quais utilizavam uma etapa de agitação em vórtice por 2 min e posterior filtração em filtros Whatman 0,2 μm . O permeado foi armazenado em frascos do tipo vial de 2 mL na coloração âmbar.

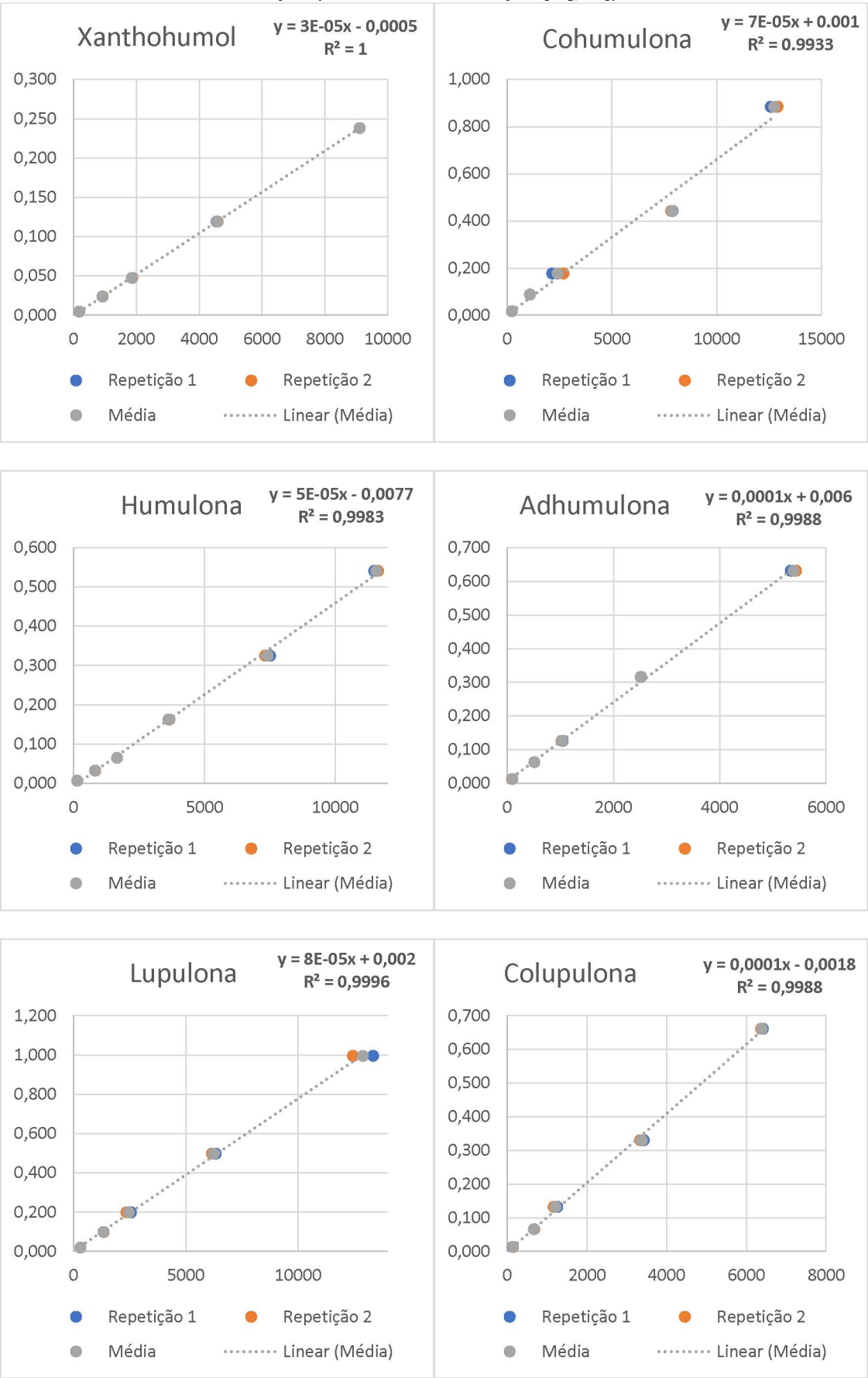
4.4 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

As curvas de calibração consistem na relação de áreas dos picos obtidos nos cromatogramas e a concentração das espécies desejadas. Essas foram injetadas utilizando o mesmo equipamento e método, desenvolvido no item 1 desse capítulo, em diferentes fatores de diluição. Essa metodologia possibilita a quantificação dessas espécies em soluções desconhecidas. Uma série de soluções com faixas de concentrações conhecidas foram preparadas para a construção das curvas. As concentrações das amostras variaram de 0,005 a 0,995 mg/mL. As concentrações iniciais podem ser observadas na FIGURA 4-5, as soluções iniciais foram diluídas na seguinte ordem: a) uma para duas partes; b) uma para cinco partes; c) uma para 10 partes; d) uma para 50 partes. Todas as relações de diluição foram calculadas em base volumétrica.

As curvas de calibração foram injetadas em duplicata e a curva utilizada nesse estudo, foi construída com a média obtida das injeções. Essa estratégia resulta no aumento de precisão das medidas. A FIGURA 4-5 apresenta as curvas de calibração para o xanthohumol, cohumulona, humulona, adhumulona, lupulona e colupulona. Onde o eixo x é a área média obtida nos cromatogramas em mAU e o eixo y é a concentração

da alíquota injetada em cada corrida. Todas as curvas construídas nessa etapa apresentam um ajuste adequado à regressão linear, como é possível constatar pelos coeficientes de regressão (R^2).

FIGURA 4-5 - CURVA DE CALIBRAÇÃO (mau vs. CONCENTRAÇÃO [mg/ml]) PARA OS SETE COMPOSTOS



Os coeficientes *a* e *b* para o cálculo das concentrações de todas as espécies estão reunidos na TABELA 4-2, onde a concentração é dada em mg/mL e é função do pico PA (mAU*s) apresentado nos cromatogramas obtidos via HPLC analítica. Sendo assim a Equação 4.1 foi utilizada para determinar a concentração das espécies.

$$C_i (mg/mL) = a \cdot PA(mAUs) + b \quad [4.1]$$

Todas as amostras avaliadas no estudo ficaram dentro do intervalo de calibração das curvas, limite máximo de concentração, sendo assim não foi necessária a utilização de diluições extra para quantificação das espécies já destacadas. Como a concentração de adlupulona obtida na cromatografia preparativa foi baixa, optou-se por quantificar essa espécie utilizando a curva da lupulona. Adlupulona e lupulona tem comportamento de absorção análogos propiciando assim essa aproximação.

TABELA 4-2 - COEFICIENTES OBTIDOS DA LINEARIZAÇÃO DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS DO LÚPULO MANTIQUEIRA

Espécie	Coeficiente		
	a	b	R ²
Xanthohumol	2.62E-05	7.06E-08	0.99998
Cohumulona	6.59E-05	4.95E-06	0.99334
Humulona	4.66E-05	-7.68E-03	0.99834
Adhumulona	1.17E-04	6.01E-03	0.99884
Lupulona	2.01E-03	7.74E-05	0.99956
Colupulona	1.03E-04	-1.81E-03	0.99876

FONTE: O AUTOR, 2022.

A preparação das amostras para a cromatografia líquida é melhor detalhada no próximo capítulo.

Essa metodologia mostrou-se mais adequada às amostras do lúpulo desse estudo e conseguiu reduzir em 40% o tempo de injeção de cada amostra. Também deve ser destacada a possibilidade de quantificar 7 diferentes compostos com boa precisão devido a separação adequada dos picos e boa definição dos mesmos.

CAPÍTULO 5 LÚPULO BRASILEIRO: SUA COMPOSIÇÃO E POTENCIAL DO VARIETAL MANTIQUEIRA PARA USO INDUSTRIAL

Bruno Aguilar Veiga^a, Maria Cinta Roda-Serrat^b, Mathias Porsmose Clausen^b, Massimiliano Errico^b, Marcos Lúcio Corazza^a, Agnes de Paula Scheer^a

^a Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Francisco H. Santos Av. 100, 81531-990, Curitiba, PR, Brasil

^b Departamento de Tecnologia Verde, Universidade do Sul da Dinamarca, Campusvej 55, 5230 Odense M, Denmark

Resumo:

Diferentes variedades de lúpulos estão se desenvolvendo em todo o mundo, a maior parte dessas são provenientes da Oceania e da América do Sul. As inflorescências do *Humulus lupulus* são conhecidas como o ingrediente que confere amargor às cervejas. Os lúpulos originários da América do Norte, Alemanha, e República Tcheca são utilizados para produzir cervejas de qualidade reconhecida. Estes lúpulos foram amplamente estudados e apresentaram atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica. Surge a dúvida se: Os lúpulos do novo mundo são comparáveis aos lúpulos europeus e norte-americanos? Esse estudo selecionou uma variedade de lúpulo brasileira conhecida como Mantiqueira. Essa matriz vegetal foi submetida a diferentes metodologias de extração com solventes líquidos, gases pressurizados e fluidos supercríticos. Foram utilizados como solvente CO₂ supercrítico, propano pressurizado e uma mistura de acetato de etila com CO₂ supercrítico. Os extratos obtidos foram quantificados em relação aos sete compostos mais abundantes no lúpulo. Análises de HPLC foram aplicadas para identificar e quantificar os alfas ácidos (humulona, cohumulona e adhumulona), beta ácidos (lupulona, colupulona e adlupulona) e o composto fenólico mais importante do lúpulo o xanthohumol. A concentração de xanthohumol encontrada nessa matriz é típica e faz dela uma fonte promissora de compostos bioativos que podem ser empregados na indústria farmacêutica. A concentração de compostos de amargor é similar aos lúpulos tchecos (em torno de 9% em bases mássicas), sendo encontrados aproximadamente 2% de óleos essenciais. A combinação desses fatores faz do Mantiqueira um bom lúpulo de finalização de

cervejas, fazendo dessa variedade de lúpulo uma matéria prima de interesse tanto na indústria de alimentos como de fármacos.

5.1 INTRODUÇÃO

O *Humulus lupulus* é uma planta mundialmente conhecida pela aplicação de suas inflorescências, também conhecidas como cones ou flores, na produção de cerveja sob o nome popular de lúpulo. Entretanto essa matriz vegetal tem diversas aplicações estudadas principalmente na indústria farmacêutica (BOCQUET, L. et al., 2018).

As regiões temperadas do hemisfério norte são as maiores responsáveis pela produção mundial. Destacam-se Alemanha, Inglaterra, República Tcheca e Estados Unidos da América como grandes produtores de lúpulo (EDWARDSON, 1952). Nos últimos anos regiões do novo mundo como: Austrália, Argentina e Brasil tem iniciado a produção de lúpulo com variedades locais. Mesmo essas regiões apresentando diferentes condições de cultivo, as safras crescem a cada ano (ORGANIZATION, 2020).

As aplicações do lúpulo na indústria cervejeira estão intimamente ligadas aos compostos de amargor, resinas denominadas alfa e beta ácidos. Sendo os primeiros uma mistura de humulonas, cohumulona e adhumulona. Já os compostos denominados beta ácidos são uma mistura de lupulona, colupulona e adlupulona. Com a popularização da cerveja artesanal o lúpulo passou a ser empregado amplamente como ingrediente de *flavor* (PALMER, 2006).

Durante a revisão bibliográfica foram encontrados estudos, nos quais foram comparados diferentes varietais de lúpulo e suas composições em relação aos compostos de amargor. O sabor e aroma do lúpulo também são influenciados pelas diferentes combinações dos compostos fenólicos, dentre ele destacam-se o xanthohumol, a rutina e as proantocianidinas. As protocianidinas também são conhecidas popularmente como taninos e são responsáveis pela sensação de adstringência na cerveja (GOIRIS et al., 2014; NICKERSON; WILLIAMS; HAUNOLD, 1986).

Os compostos fenólicos apresentam comprovada ação antioxidante. No lúpulo encontram-se grandes concentrações do xanthohumol, composto com propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias e anticarcinogênica já comprovadas (GERHÄUSER, 2008; INIGUEZ; ZHU, 2021; LUPINACCI et al., 2009; STEVENS; PAGE, 2004). Devido a essas propriedades alguns trabalhos buscaram empregar extração utilizando fluidos em estado supercrítico para obtenção de extratos ricos em xanthohumol (HE et al., 2005; RÓJ et al., 2015). Porém a combinação de dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) e solventes orgânicos para aumento de rendimento de extração de fenólicos precisa ser melhor compreendida.

A combinação dos compostos de amargor e compostos fenólicos citados torna o lúpulo o principal responsável pelos potenciais benefícios do consumo da cerveja. Dentre esses benefícios estão a redução do risco de doenças cardiovasculares, atividade antioxidante e ação inibidora de organismos patogênicos (BOCQUET, Laetitia et al., 2018; CHEN; BLUMBERG, 2008; LUZAK et al., 2016; PROESTOS; KOMAITIS, 2008).

A indústria farmacêutica apresenta uma tendência de aumento em investimentos para obtenção de compostos ativos de fontes naturais (LIU; WANG, 2008). Nesse cenário destaca-se a produção de fármacos de origem natural via obtenção de extratos ativos utilizando scCO₂ (KNEZ et al., 2014). Portanto, o lúpulo sendo uma matriz rica em componentes, com alto potencial, deve ser estudada quanto à capacidade de gerar extratos bioativos.

O lúpulo Mantiqueira é uma variedade de produção brasileira. Essa mutação surgiu da adaptação de mudas provenientes da América do Norte em contato com plantas selvagens brasileiras. Essa nova variedade apresenta grande potencial comercial e precisa ser estudada visando avaliar o potencial de aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica (VEIGA et al., 2021a).

Técnicas de cromatografia são bastante difundidas para quantificação e identificação de compostos presentes em matrizes vegetais, tais como o lúpulo. Estudos anteriores empregaram diferentes metodologias de HPLC para caracterizar lúpulos, seus extratos e cervejas (KELLNER et al., 2007; LANGEZAAL et al., 1990; MAGALHÃES et al.,

2007; STEVENS et al., 2000; TOFANA et al., 2009). Surge então o questionamento se os lúpulos do novo mundo, principalmente o brasileiro, são matrizes promissoras para a indústria de alimentos e farmacêutica.

A melhor forma de iniciar os estudos que podem responder esse questionamento é caracterizar os extratos de lúpulo Mantiqueira obtidos por diferentes metodologias de extração por fluidos pressurizados. Essa caracterização foi feita pelo emprego da técnica de HPLC, que possibilitou a quantificação dos seis principais compostos de amargor e o xanthohumol.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Reagentes

Ácido fórmico 98% de pureza, fornecido pela Sigma Aldrich, de Søborg – Denmark, acetonitrila grau de pureza cromatográfico, fornecido pela VWR Prolabo, de Søborg – Denmark, água deionizada tipo I, tipo miliQ produzida pelo equipamento ELGA PureLab® Chorus, de Glostrup – Denmark e metanol grau de pureza cromatográfico fornecido pela VWR Prolabo, de Søborg - Denmark)

5.2.2 Amostras

Esse busca analisar os extratos de flores da planta feminina do *Humulus lupulus*, varietal brasileira denominada como Mantiqueira, obtidos conforme descrito em trabalho anterior (VEIGA et al., 2021b).

Com o intuito de avaliar a eficiência de extração dos métodos utilizando fluidos pressurizados assistidos ou não por cossolvente orgânico, as flores de lúpulo foram submetidas a extração por metanol. Esse solvente é amplamente empregado para

extração e preparação de soluções de compostos fenólicos (OVERK et al., 2008). O procedimento de extração é detalhado abaixo.

5.2.2.1 Preparação das amostras

Tanto os extratos provenientes das extrações que utilizaram fluidos pressurizados, quanto os extratos das flores liofilizadas de lúpulo foram submetidos a uma extração prévia com solução metanólica. Essa etapa foi necessária para viabilizar a quantificação dos compostos via HPLC.

5.2.2.1.1 Procedimento de extração para as flores de lúpulo

Primeiramente preparou-se a solução solvente, que consiste em solução metanólica (75%), ácido fórmico (1%) e água (24%) em relações mássicas. Essa solução foi utilizada em todo o processo de obtenção de extratos das flores de lúpulo.

A extração deu-se nos passos descritos abaixo em ordem cronológica de execução:

- i. Limpeza e enxague, com a solução solvente, do UltraTurrax T18 (IKA, Aarhus, Denmark) e do tubo tipo Falcon de 50 ml.
- ii. Pesagem de $0,5014 \pm 0,0003$ g de lúpulo liofilizado. Foram utilizadas flores inteiras.
- iii. Adição de 15 mL de solução metanólica.
- iv. A mistura foi submetida a agitação/moagem em fase líquida, pelo UltraTurrax, por 2 min.
- v. Após essa etapa o equipamento foi enxaguado com 5 mL de solução solvente, que foi adicionada ao tubo Falcon.
- vi. Os passos IV e V foram repetidos mais duas vezes.
- vii. Em seguida a mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto.
- viii. Os tubos foram submetidos a banho ultrassônico por 10 min em 35 °C.

- ix. A fase sólida foi separada da líquida via centrifugação à temperatura de 25 °C e velocidade de 3000 rpm durante 20 min.
- x. O sobrenadante foi coletado com o auxílio de uma pipeta de 5 mL e acondicionado em um balão volumétrico de 100 mL.
- xi. Uma nova alíquota de 15 mL de solução solvente foi adicionada a fase sólida que se manteve no fundo do tubo Falcon.
- xii. Os passos VII, VIII, IX e X foram executados novamente por mais duas vezes.
- xiii. Finalmente 10 mL de solução solvente foi adicionado ao corpo de fundo restante.
- xiv. Essa solução foi submetida a um banho ultrassônico por 15 min a 35 °C.
- xv. Essa mistura foi mantida em contato por 12 h em temperatura ambiente.
- xvi. A mistura final foi filtrada sob vácuo e a massa retida no filtro foi lavada com mais 15 mL de solução solvente.
- xvii. A fase líquida proveniente da filtração foi adicionada ao balão volumétrico de 100 mL.
- xviii. Finalmente foram adicionados aproximadamente 15 mL de solução de solvente para completar os 100 mL de extrato metanólico das flores liofilizadas de lúpulo.

5.2.2.1.2 Procedimento de extração para os extratos obtidos por fluidos pressurizados

A mesma solução solvente, descrita no item anterior, foi utilizada para preparação das amostras que seriam submetidas ao HPLC. Nessa seção será descrita a preparação dos extratos obtidos através da extração por fluidos pressurizados.

- i. As alíquotas de extrato foram pesadas em tubos de eppendorf de 2 mL. Foram preparadas 3 amostras de cada extrato, cada uma das amostras de $10,5 \pm 0,2$ mg.
- ii. Foi adicionado 2 mL de solução solvente ao eppendorf com a amostra de extrato.

- iii. A mistura foi submetida a 1 min de vórtice, para dissolução.
- iv. Posteriormente essa solução foi submetida a banho ultrassônico por 35 °C por 20 min.
- v. Após 5 min de centrifugação a 1200 RPM o sobrenadante foi recolhido e adicionado a um balão volumétrico de 5 mL.
- vi. Ao corpo de fundo foi adicionado mais 1 mL de solução solvente.
- vii. A nova mistura foi submetida a 1 min de vórtice.
- viii. Novamente foi empregado um banho ultrassônico em 35 °C, agora por 10 min.
- ix. O sobrenadante foi recolhido, após a centrifugação a 1200 RPM por 5 min, e adicionado ao balão de 5 mL.
- x. Finalmente o volume necessário de solução solvente foi adicionado para completar os 5 mL de amostra.
- xi. Toda essa solução foi filtrada com auxílio de um filtro de seringa de PTFE 0,22 µm. O filtrado foi injetado em vial âmbar de 2 mL.

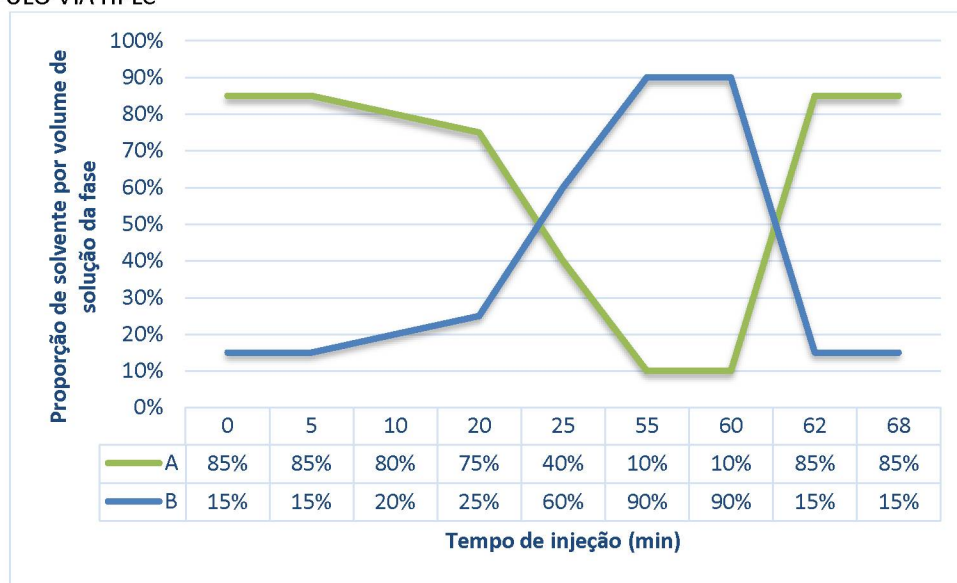
Essas amostras e os extratos de flores liofilizadas de lúpulo foram injetadas em triplicata no método de separação não isocrático, que visa quantificar os sete compostos mais abundantes no lúpulo Mantiqueira. Essa metodologia de HPLC é descrita de maneira mais detalhada a seguir.

5.2.3 Método analítico

Os principais compostos do lúpulo foram quantificados utilizando a cromatografia de alta performance em estado líquido, HPLC, como principal método analítico. Este trabalho partiu do estudo realizado Bessada 2016, que quantificou compostos fenólicos em *COLEOSTEPHUS myconis*. Essa metodologia mostrou-se adequada para mircetina, quercetina e seus derivados, porém os tempos de retenção são bastante distintos para os ácidos alfa e beta do lúpulo (BESSADA et al., 2016). Dessa maneira a metodologia foi adaptada e acabou por resultar em uma curva cromatográfica mais alongada e com diferentes gradientes de solvente A, solução de ácido fórmico a

0,1 % massa/massa em água, e solvente B, acetonitrila. A FIGURA 5-1 ilustra os gradientes utilizados em todas as corridas de HPLC desse estudo.

FIGURA 5-1 - GRADIENTE DA FASE MÓVEL UTILIZADO NA QUANTIFICAÇÃO DOS PRINCIPAIS COMPOSTOS DO LÚPULO VIA HPLC



Fonte: o Autor, 2022.

O equipamento utilizado foi um HP 1200 series, Agilent Technologies Aps, Nærum, Denmark. Equipado com um detector de matriz de fotodiodos. A fase estacionária era uma coluna C18 (Gemini 5 μ C18 110A, 250x4,6 mm i.d., Phenomenex Aps, Værløse, Dinamarca) operada a 35°C.

Xanthohumol, humulona, cohumulona, adhumulona, lupulona, colupulona e adlupulona foram quantificadas utilizando padrões preparados no departamento de engenharia química da SDU no campus de Odense. Os compostos isolados foram utilizados na elaboração de curvas de calibração a partir dos padrões, suas respectivas concentrações e purezas. Todas as curvas puderam ser ajustadas a modelos lineares resultando em $R^2 > 0,99$ para todos os sete compostos.

Para a preparação dos padrões foi utilizado um cromatógrafo preparativo Marca Thermo Fisher Scientific, modelo Dionex UltiMate 3000 Binary Semi-preparative LC equipado com uma coluna Develosil™ ODS-HG LC (250 x 20 mm, particle size 5 μ m).

Resultando em sete padrões com purezas 60,6 até 93,1 % valores superiores aos encontrados no padrão ICE-3 da American Society of Brewing Chemists. O padrão ICE-3 é composto por uma mistura de 44,64 % de humulonas e 24,28 % lupulonas ((AHA), 2010).

5.2.4 Análise dos dados

Com os dados obtidos, foram calculados os rendimentos totais, eficiências de extração por componente e pureza do componente no extrato.

O rendimento foi calculado conforme a Equação 5.1:

$$Rendimento(\%) = \frac{Massa\ de\ extrato}{Massa\ de\ matriz} \cdot 100\% \quad [5.1]$$

Já a eficiência de extração por componente, EE, foi calculada utilizando a Equação 5.2:

$$EE(\%) = \frac{Massa\ de\ componente\ i\ extraído}{Massa\ de\ componente\ i\ na\ matriz} \cdot 100\% \quad [5.2]$$

A significância estatística ($p < 0,05$) foi avaliada por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey usando o software Statistica 10 (Statsoft Inc., USA).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) foi utilizada para avaliar o efeito dos parâmetros na extração de xanthohumol e dos ácidos presentes nos extratos. O software Statistica também foi utilizado para otimizar a concentração de Xanthohumol, bem como correlacionar a extração de cada composto em função da temperatura e pressão de extração.

Os gráficos de superfície de resposta foram desenvolvidos usando as equações polinomiais quadráticas ajustados em função dos dois efeitos: temperatura e pressão.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já avaliado em Veiga, (2021) os extratos obtidos do Lúpulo Mantiqueira apresentaram uma alta atividade antioxidantes, devido à concentração de compostos fenólicos (VEIGA et al., 2021b). Visando entender melhor a composição desses extratos eles foram submetidos a cromatografia líquida de alta eficiência. As condições de extração foram sumarizadas na TABELA 5-1:

TABELA 5-1 - RESUMO DOS RENDIMENTOS E CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO

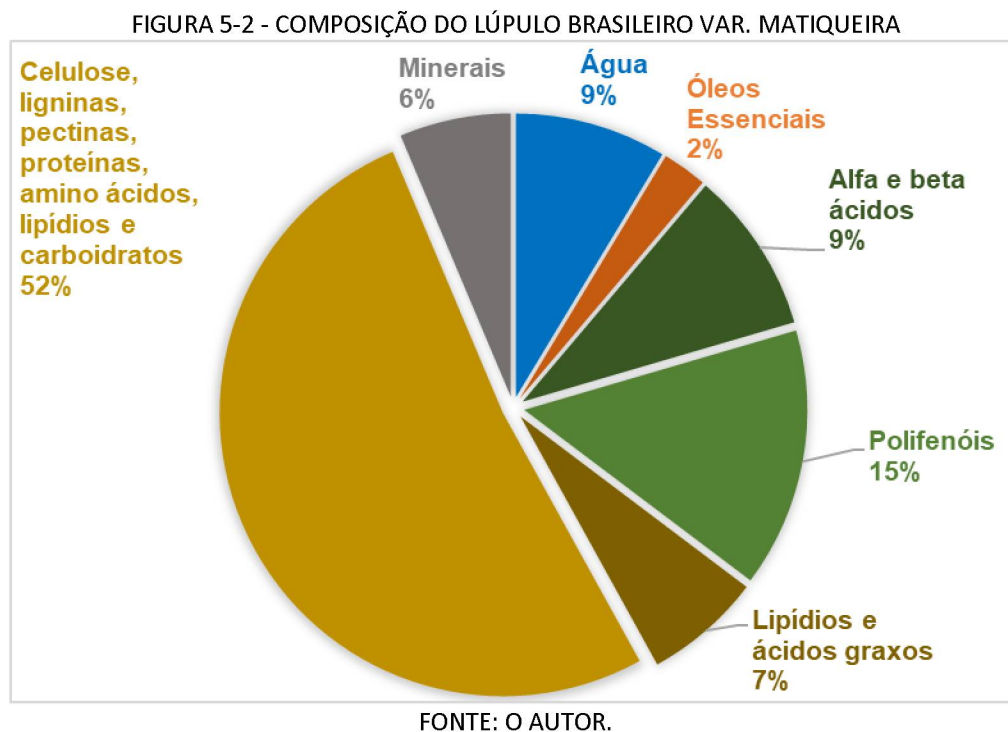
Run	Solvente + Cossolvente	T (°C)	P (MPa)	MR ⁸	Tempo de Extração (min)	Rendimento de Extração (mássico %)
1	scCO ₂	40	15	-	110	5,6
2		40	25		110	6,0
3		80	15		110	4,7
4		80	25		110	7,6
5, 6, 7		60	20		110	6,2 ± 0,1
8	Propano Pressurizado	20	3	-	70	3,9
9		20	10		70	2,7
10		60	3		70	5,8
11		60	10		70	6,0
12, 13, 14		40	6.5		70	4,2 ± 0,2
15	scCO ₂ + EtOAc	40	15	2	60	9,6
16		40	25	2	60	7,8
17		80	15	2	60	7,7
18		80	25	2	60	10,2
19, 20, 21		60	20	2	60	8,3 ± 0,2
22		40	15	1	60	5,6
23		40	25	1	60	7,1
24		80	15	1	60	6,8
25		80	25	1	60	7,6
26, 27, 28		60	20	1	60	8,1 ± 0,2
29		40	15	2	30	9,4
30		80	25	2	30	10,5
31	EtOH	60	20	2	30	8,7

FONTE: VEIGA, (2021).

As extrações e avaliações das flores de lúpulo liofilizadas possibilitaram elaborar um diagrama que representa a composição média do lúpulo brasileiro da variedade Mantiqueira, conforme mostrado na FIGURA 5-2. Essa composição é bastante distinta de lúpulos tradicionalmente utilizados como fonte de amargor, entretanto ela é comparável aos lúpulos clássicos da República Tcheca e Inglaterra, muito utilizados como fonte de amargor e aroma nas *pilsners* da região da Bavária e nas ales do Reino

⁸ MR – Mass Ratio, refere-se à relação das massas de cossolvente e a massa do leito de lúpulo no início da extração semicontínua. $MR = [\text{massa de cossolvente no início da extração (g)}] / [\text{massa de lúpulo no início da extração (g)}]$.

Unido (MACHADO et al., 2018; NICKERSON; WILLIAMS; HAUNOLD, 1986). No lúpulo Mantiqueira destaca-se a concentração de xanthohumol, correspondendo a 0,88 % da massa da planta, sendo assim esse composto representa 5,87 % dos polifenóis encontrados nessa matriz vegetal.



Com o intuito de comparar o lúpulo Mantiqueira com outros varietais consagrados na indústria cervejeira foi construída a TABELA 5-2. Nela é possível encontrar a concentração típica de alfa ácidos e beta ácidos, além do conteúdo de óleos essenciais e aplicação típica de cada lúpulo.

É possível perceber que lúpulos que apresentam maiores concentrações de óleos essenciais tem melhor aplicação para finalização de cervejas, conferindo assim características sensoriais de aroma e sabor. Devido a isso os lúpulos de alta concentração de alfa ácidos são geralmente utilizados no processo de fervura para amargor.

O Mantiqueira tem composição que combina uma concentração de óleos essenciais de média a alta a uma concentração de compostos de amargor comparável aos lúpulos ingleses. Assim sendo, o lúpulo Mantiqueira é uma boa opção para amargor

e uma melhor opção para finalização de cervejas aromáticas. Essas características são muito interessantes para a indústria cervejeira.

TABELA 5-2 - COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO DE DIFERENTES VARIETAIS DE LÚPULO COM O MANTIQUEIRA

Varietal	Lúpulo		Composição (% em massa)			Óleos (mL/100 g de Lúpulo)
	Origem	Propósito	Alfa Ácidos	Beta Ácidos	Alfa/Beta ácidos	
Fuggle	Inglaterra	Amargor e aroma	4,5 - 6,0	1,9 - 2,6	2,3	1,0
Goldings		Amargor e aroma	4,5 - 5,5	2,5 - 3,1	1,8	1,4
Hallertauer	Alemanha	Amargor e aroma	3,5 - 5,5	3,5 - 5,5	1,0	1,0
Perle		Amargor	6,0 - 8,5	3,8 - 5,3	1,6	1,0
Saazer	República Tcheca	Aroma	3,0 - 4,5	3,3 - 5,0	0,9	0,4
Cascade	Estados Unidos da América	Aroma	7,8	5,5	1,4	1,5
Chinook		Amargor e aroma	12,0 - 14,0	3,0 - 3,6	3,9	2,0
Nugget		Amargor	12,0 - 14,0	3,6 - 4,2	3,3	2,0
Galaxy	Austrália	Aroma	17,3	9,9	1,7	3,7
Vic Secret		Amargor e aroma	18,8	7,75	2,4	3,7
Mantiqueira	Brasil	Amargor e aroma	5,7	3,6	1,6	2,6

FONTE: ADAPTADO DE HOPS (NEVE, 1991) E (TEDONE et al., 2020)

A TABELA 5-3 apresenta a composição, quantificada por HPLC, de todos os extratos obtidos através das várias técnicas de extração por fluidos pressurizados. Nessa tabela estão dispostas as frações molares e Eficiência de Extração (EE), calculada conforme Equação 5.2, para o xanthohumol, para os três alfa ácidos e para os três beta ácidos.

TABELA 5-3 - COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS E EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO

(continua)

Run ⁹	Massa de amostra ± desvio padrão (g)		Massa conhecida (massa%)	Xanthohumol		Humulona		Cohumulona		Adhumulona	
				Fração mássica (%)	Eficiência de extração (%)	Fração mássica (%)	Eficiência de extração (%)	Fração mássica (%)	Eficiência de extração (%)	Fração mássica (%)	Eficiência de extração (%)
1	0,0088	± 0,0002	98,1	0,13	0,7	23,02	61,8	18,46	55,9	12,96	52,8
2	0,0109	± 0,0004	98,4	0,12	0,7	24,50	70,5	19,63	63,7	13,68	59,8
3	0,0115	± 0,0003	93,6	0,00	0,0	18,94	42,7	16,80	42,7	13,10	44,8
4	0,0115	± 0,0002	94,9	0,11	0,8	23,80	86,8	19,43	79,9	13,86	76,8
5, 6, 7	0,0107	± 0,0002	98,9	0,06	0,3	22,69	67,5	18,81	63,1	13,89	62,7
8	0,0100	± 0,0003	54,4	0,00	0,0	13,66	25,6	11,00	23,2	7,91	22,5
9	0,0106	± 0,0005	80,8	0,00	0,0	19,95	25,9	15,52	22,7	11,53	22,7
10	0,0107	± 0,0001	70,9	0,00	0,0	19,78	55,0	15,77	49,4	10,97	46,3
11	0,0106	± 0,0002	71,3	0,00	0,0	18,90	54,4	15,46	50,1	10,67	46,6
12, 13, 14	0,0102	± 0,0002	79,5	0,00	0,0	19,64	39,9	15,63	35,7	11,66	36,0
15	0,0106	± 0,0003	92,6	5,07	48,5	23,74	109,4	18,82	97,8	13,91	97,3
16	0,0104	± 0,0002	67,6	3,51	27,2	19,13	72,4	14,26	60,2	10,51	59,8
17	0,0106	± 0,0001	84,9	5,48	41,9	21,37	79,0	17,32	72,1	12,98	72,8
18	0,0107	± 0,0003	53,0	2,69	27,3	16,51	81,7	12,06	66,7	8,77	65,3
19, 20, 21	0,0106	± 0,0003	79,3	5,34	44,1	20,97	83,5	17,00	76,3	12,61	76,2
22	0,0120	± 0,0001	99,0	3,25	6,5	24,55	23,6	19,50	21,1	14,90	21,7
23	0,0106	± 0,0001	92,4	5,11	35,3	24,06	80,3	19,01	71,5	13,73	69,6
24	0,0105	± 0,0001	72,8	4,96	30,6	20,23	60,2	16,41	55,0	11,36	51,3
25	0,0106	± 0,0004	75,9	3,52	25,6	21,85	76,3	17,50	69,0	12,27	65,0
26, 27, 28	0,0107	± 0,0003	90,4	3,95	31,9	24,03	93,4	19,22	84,2	13,59	80,3
29	0,0105	± 0,0003	24,4	3,65	34,1	5,95	26,8	5,07	25,7	3,77	25,8
30	0,0107	± 0,0001	28,6	3,71	38,7	7,23	36,5	5,96	33,9	4,33	33,2
31	0,0103	± 0,0002	26,6	3,82	33,3	23,02	61,8	18,46	55,9	12,96	52,8

⁹ Os ensaios de 1 ao 7 foram realizados utilizando o CO₂ supercrítico como solvente, os de 8 a 14 o propano pressurizado, os de 15 a 21 o CO₂ supercrítico + acetato de etila em MR=2, os ensaios de 22 a 28 o CO₂ supercrítico + acetato de etila em MR=1 e os ensaios de 29 a 31 o CO₂ supercrítico + etanol em MR=2. Maiores detalhes das condições de extração são apresentados na TABELA 5.1.

TABELA 5-4 - COMPOSIÇÃO DOS EXTRATOS E EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO

(conclusão)

Run	Massa de amostra ± desvio padrão (g)		Massa conhecida (massa%)	Lupulona		Colupulona		Adlupulona	
				Fração mássica (%)	Eficiência de extração (%)	Fração mássica (%)	Eficiência de extração (%)	Fração mássica (%)	Eficiência de extração (%)
1	0,0088	± 0,0002	98,1	22,55	71,4	13,86	48,5	7,12	66,7
2	0,0109	± 0,0004	98,4	20,21	68,6	13,35	50,1	6,88	69,1
3	0,0115	± 0,0003	98,0	19,99	41,7	16,63	30,9	8,11	43,1
4	0,0115	± 0,0002	94,9	20,06	86,3	11,49	54,6	6,12	77,8
5, 6, 7	0,0107	± 0,0002	98,9	20,96	73,5	14,84	57,5	7,66	79,4
8	0,0100	± 0,0003	54,4	11,22	24,8	7,08	17,3	3,58	23,3
9	0,0106	± 0,0005	80,8	16,55	25,4	11,43	19,3	5,82	26,3
10	0,0107	± 0,0001	70,9	11,40	37,4	8,55	31,0	4,41	42,8
11	0,0106	± 0,0002	71,3	12,54	42,5	9,01	33,8	4,70	47,1
12, 13, 14	0,0102	± 0,0002	79,5	15,64	37,5	11,22	29,7	5,76	40,9
15	0,0106	± 0,0003	92,6	15,82	86,0	10,00	60,0	5,20	83,4
16	0,0104	± 0,0002	67,6	10,28	45,4	6,53	31,9	3,39	44,3
17	0,0106	± 0,0001	84,9	13,82	60,2	9,10	43,8	4,80	61,9
18	0,0107	± 0,0003	53,0	6,36	36,8	4,32	27,6	2,30	39,3
19, 20, 21	0,0106	± 0,0003	79,3	11,54	54,2	7,72	40,0	4,11	57,0
22	0,0120	± 0,0001	99,0	17,66	20,0	12,78	16,0	6,33	21,2
23	0,0106	± 0,0001	92,4	14,56	57,3	10,47	45,5	5,49	63,8
24	0,0105	± 0,0001	72,8	9,42	33,1	6,80	26,4	3,62	37,6
25	0,0106	± 0,0004	75,9	9,94	41,0	7,10	32,4	3,75	45,7
26, 27, 28	0,0107	± 0,0003	90,4	14,16	65,0	10,19	51,7	5,30	71,9
29	0,0105	± 0,0003	20,8	3,68	19,6	1,59	9,3	0,73	11,4
30	0,0107	± 0,0001	24,8	4,24	25,2	1,99	13,1	1,09	19,2
31	0,0103	± 0,0002	22,7	3,51	17,3	1,59	8,6	0,98	14,4

FONTE: O AUTOR.

5.3.1 Avaliação de correlação de efeitos

Utilizando toda a nuvem de dados obtida, uma avaliação estatística de correlação que utiliza como efeitos a temperatura, a pressão, o tipo de solvente pressurizado, o cossolvente utilizado ou não de cossolvente e a razão entre massa de cossolvente por massa inicial de lúpulo na extração (MR).

Os principais pontos foram sumarizados e são apresentados na forma de tópicos:

- O uso de cossolvente auxiliou no aumento da concentração dos compostos analisados nos extratos obtidos. O Acetato de etila teve maior eficiência de extração que o etanol.
- O rendimento global de extração foi favorecido pelo aumento da temperatura e pressão de extração. O CO₂ em estado supercrítico é um melhor solvente que o propano para os compostos analisados. O aumento da razão cossolvente (MR) induziu em um aumento de rendimento.
- O aumento da temperatura favoreceu a extração dos compostos: xanthohumol, humulona, cohumulona e adhumulona, porém o efeito foi significativo para a scCO₂. Nos demais compostos o efeito da temperatura foi negativo, ou seja, o aumento da temperatura induziu a uma queda na extração dos compostos avaliados. No entanto é importante ressaltar que esse efeito negativo foi estatisticamente menor que o erro médio observado, logo essa tendência precisa ser mais bem avaliada. O efeito da temperatura sobre a extração dos alfas e betas ácidos foi antagônico.
- O aumento da pressão também favoreceu a extração dos compostos: xanthohumol, humulona, cohumulona e adhumulona e colupulona. Essa variável apresentou o maior impacto sobre a extração desses compostos. Nos demais casos o efeito foi negativo, porém menor que a variação média observada nos experimentos e também deve ser mais bem estudada.
- O efeito do aumento da MR foi positivo para a extração dos seguintes compostos: xanthohumol, cohumulona e adhumulona. Por outro lado, devido ao aumento de

extração de diferentes compostos, o aumento da MR induziu a redução da pureza da cohumulona, adhumulona, lupulona, colupulona e adlupulona.

- Os extratos obtidos utilizando o propano pressurizado não continham xanthohumol em quantidade significativa para mensuração no método aplicado.

A análise de variância dos dados foi dividida em blocos que se diferem em relação aos solventes utilizados e relações de massa de cossolvente por massa de lúpulo no início da extração semicontínua, MR.

5.4 ANÁLISE DE VARIÂNCIA

Primeiramente será avaliado o conjunto de extrações realizadas utilizando apenas o scCO_2 como solvente. Essas extrações foram identificadas como Run 1 até 7. Sendo um planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central.

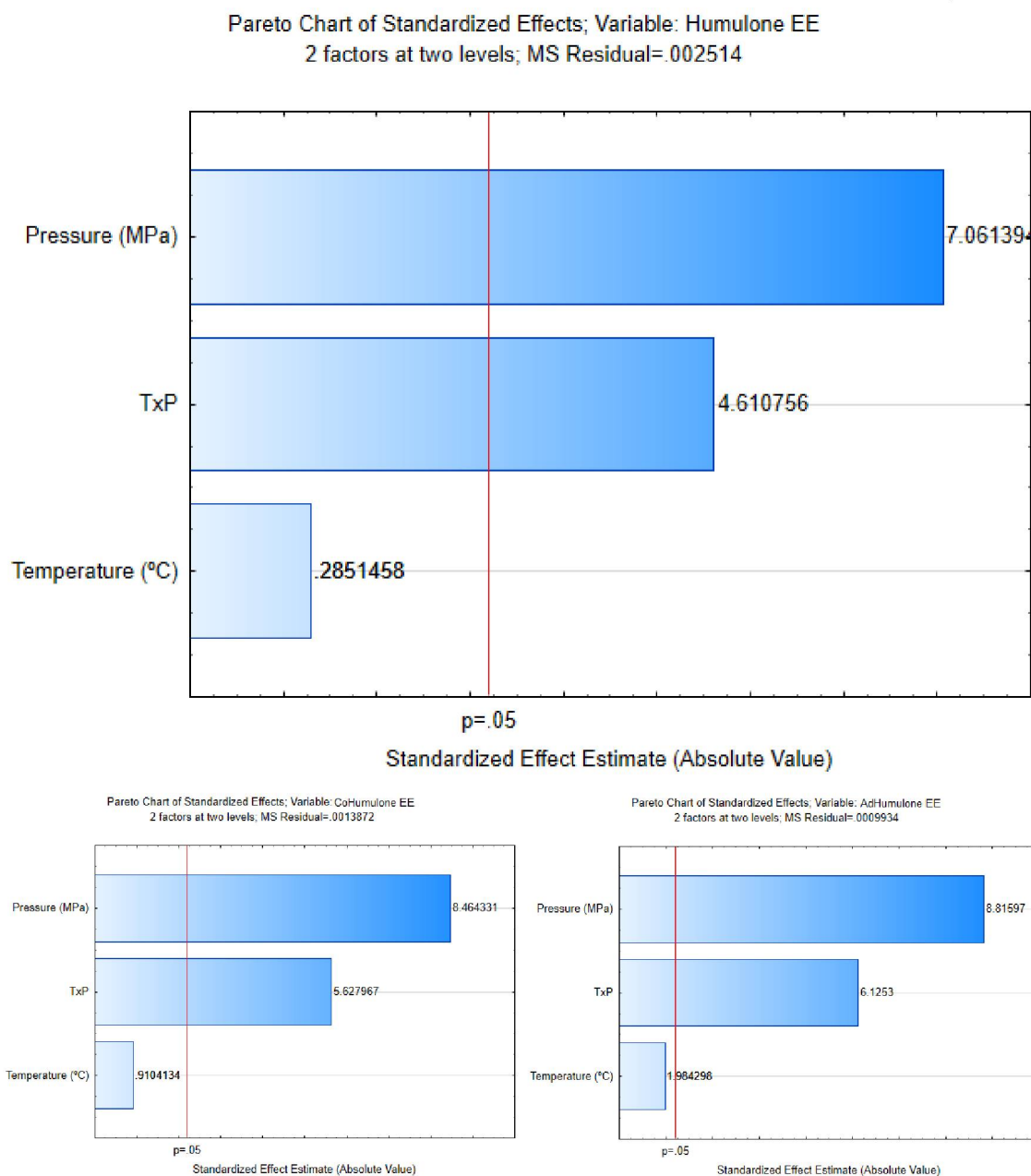
5.4.1 Extração com scCO_2

Os fatores avaliados foram a temperatura, a pressão e a interação entre ambos. O rendimento foi favorecido pelo aumento da temperatura e pressão. O aumento do rendimento é consequência do aumento da solubilidade dos compostos no solvente em maior temperatura. O aumento da pressão induz um aumento de densidade do fluido que resulta em maior poder de solvatação.

Para os níveis de temperatura e pressão estudados, não foi possível encontrar uma correlação para a concentração e eficiência de extração do xanthohumol.

As eficiências de extração dos três alfa ácidos humulona, cohumulona e adhumulona foram favorecidas pelo aumento da pressão e a combinação dos fatores T e P, como é possível observar nos diagramas de Pareto, que estão representados na FIGURA 5-3.

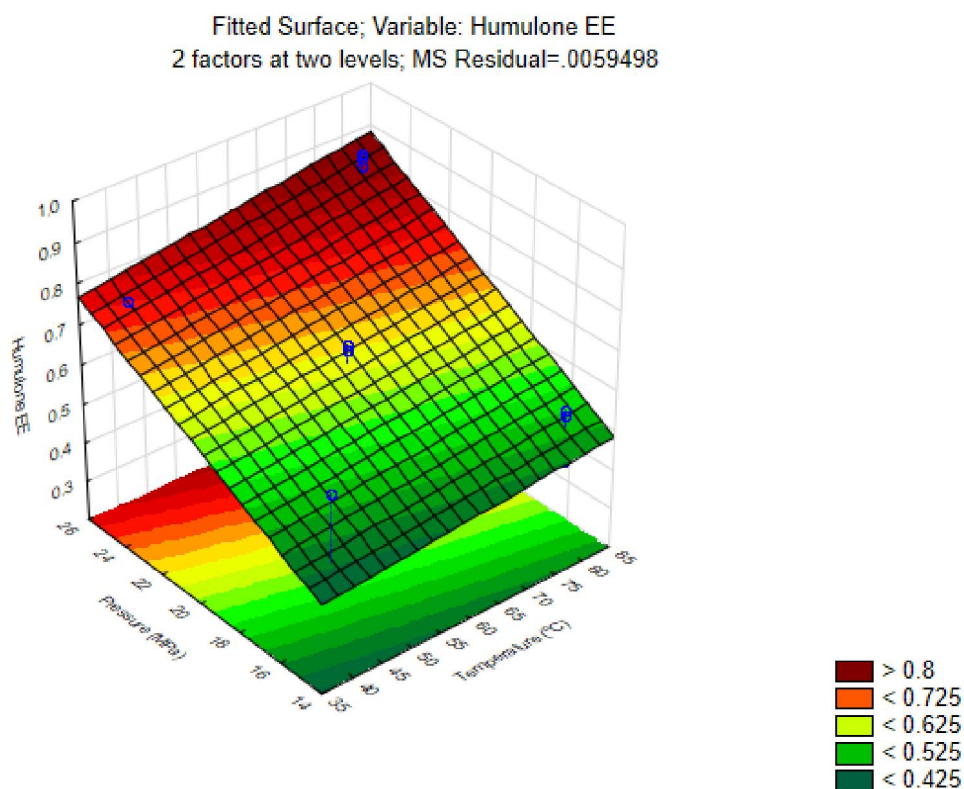
FIGURA 5-3 - DIAGRAMA DE PARETO PARA EFEITOS SOBRE A EE DOS ALFAS ÁCIDOS NAS EXTRAÇÕES COM scCO₂



FONTE: O AUTOR.

Como o comportamento de extração dos três alfa ácidos são análogos, optou-se por apenas apresentar a superfície de resposta para a humulona, FIGURA 5-4, utilizando um modelo que desconsidera o fator temperatura. Gerando assim uma superfície de resposta onde o rendimento de extração da humulona é descrito pela Equação 5.3, com r quadrado igual a 0,9223:

FIGURA 5-4 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A EE DA HUMULONA NAS EXTRAÇÕES COM scCO₂

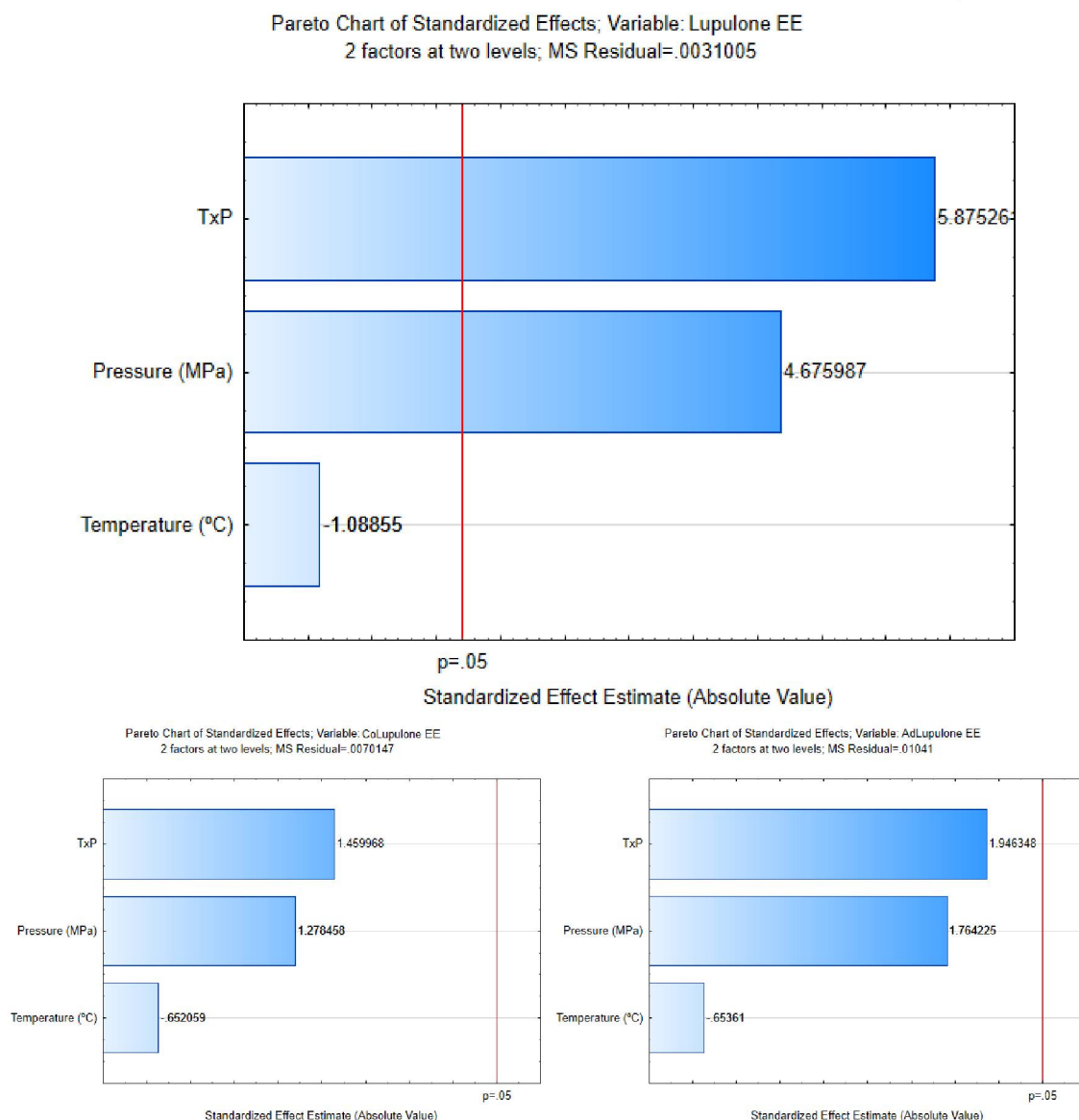


FONTE: O AUTOR.

$$\text{Humulona EE (\%)} = 1,88 + 2,55 \cdot P + 0,01 \cdot P \cdot T \quad [5.3]$$

O mesmo tratamento estatístico foi aplicado às eficiências de extração dos três beta ácidos lupulona, colupulona e adlupulona os efeitos dos fatores T e P, na faixa estudada, apenas foram estatisticamente significativos para a eficiência de extração da lupulona, conforme é possível observar nos diagramas de Pareto, FIGURA 5-5. Sendo um forte indicativo que as a adlupulona e a colupulona estão mais disponíveis na matriz que a lupulona.

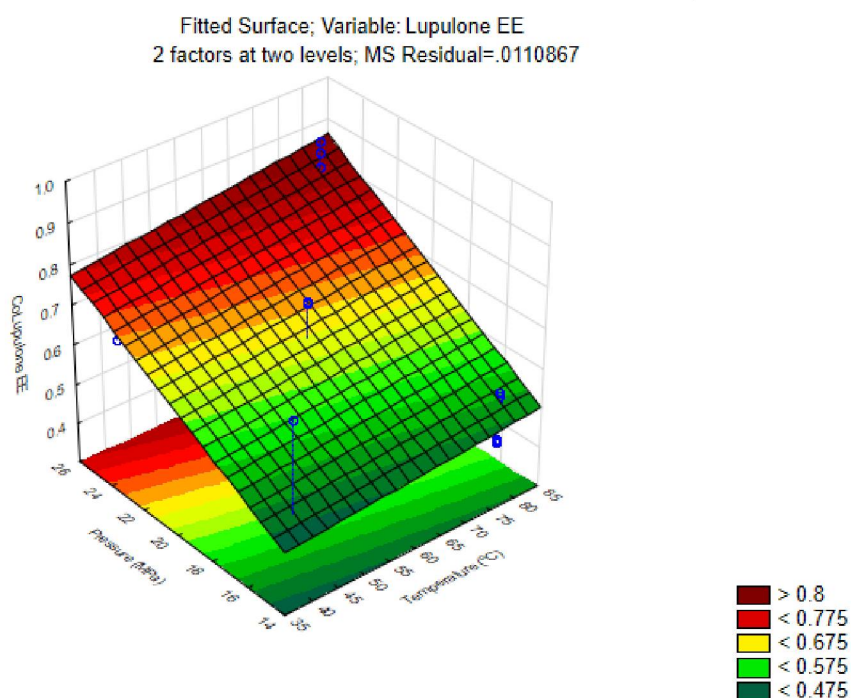
FIGURA 5-5 - DIAGRAMA DE PARETO PARA EFEITOS SOBRE A EE DOS BETAS ÁCIDOS NAS EXTRAÇÕES COM scCO₂



FONTE: O AUTOR.

A superfície de resposta para a lupulona, FIGURA 5-6, utilizando um modelo que considera o fator pressão e a interação temperatura e pressão. Gerando assim uma superfície de resposta onde o rendimento de extração da lupulona é descrito pela Equação 5.4, com r quadrado igual a 0,8989:

FIGURA 5-6 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A EE DA LUPULONA NAS EXTRAÇÕES COM scCO₂



FONTE: O AUTOR.

$$\text{Lupulona EE (\%)} = 8,237 + 2,418 \cdot P + 0,0068 \cdot P \cdot T \quad [5.4]$$

Foi observado que o uso de scCO₂ como solvente pode ser uma tecnologia promissora para obtenção de extratos de lúpulo com altas concentrações de alfa e beta ácidos. Esse solvente tem seu poder de solvatação fortemente dependente da pressão devido a variação da densidade do fluido supercrítico. O modelo das superfícies de respostas apresentadas para a eficiência de extração de ambos os ácidos (alfa e beta) indica, que dentro da faixa avaliada nesse estudo, a extração é favorecida pelo incremento da pressão. O incremento da temperatura induz a um aumento na taxa de transferência de massa da matriz para a fase supercrítica devido ao aumento nos coeficientes de difusão e convecção mássica dos compostos de amargor.

5.4.2 Extração com propano pressurizado

O conjunto de extrações realizados utilizando apenas o propano pressurizado como solvente, identificadas como Run 8 até 14, também compõe um planejamento fatorial 2² com triplicata no ponto central.

Os fatores avaliados foram a temperatura, a pressão e a interação entre ambos. O rendimento foi favorecido pelo aumento da temperatura. O aumento do rendimento foi observado como consequência de um possível aumento da solubilidade dos compostos no solvente em maior temperatura. A variação da pressão não causou variações estatisticamente relevantes no rendimento global da extração por propano pressurizado.

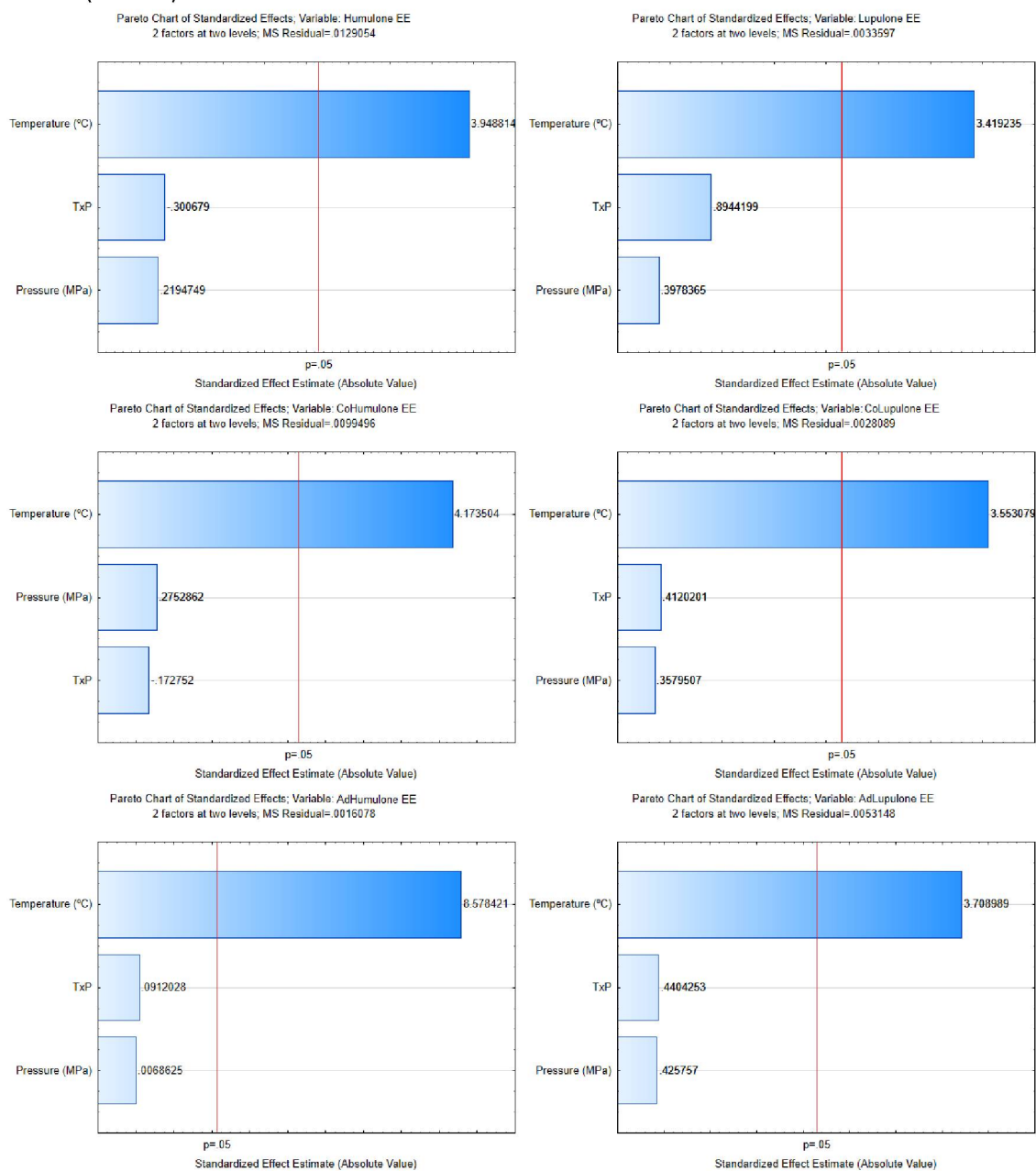
Propano pressurizado não foi eficiente na extração do xanthohumol, esse comportamento pode ser explicado pela característica apolar do solvente utilizado. Esse solvente apresentou baixa interação com o principal flavonoide do lúpulo. No entanto o propano pressurizado demonstrou grande potencial para obtenção de extratos ricos em alfa e beta ácidos, efeito esperado.

A temperatura foi o principal fator com efeito sobre a eficiência de extração dos alfa e beta ácidos, como é possível observar nos diagramas de Pareto obtidos para o planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, FIGURA 5-7. O incremento da temperatura em todos os casos avaliados induziu a um aumento na eficiência de extração (EE), comportamento esperado em fluidos pressurizados em estado subcrítico. O aumento do poder de solvatação do propano, pelo aumento da temperatura, foi mais importante que a variação de densidade do solvente, dentro da faixa de pressão estudada.

Superfícies de resposta foram construídas utilizando temperatura e pressão, considerando apenas os efeitos estatisticamente relevantes e são apresentadas para a Humulona (FIGURA 5-8) e lupulona (FIGURA 5-9), os quais são, respectivamente os alfa ácido e beta ácido com maiores frações nos extratos. As equações 5.5 e 5.6 descrevem os modelos matemáticos das superfícies de resposta obtidas para esses compostos.

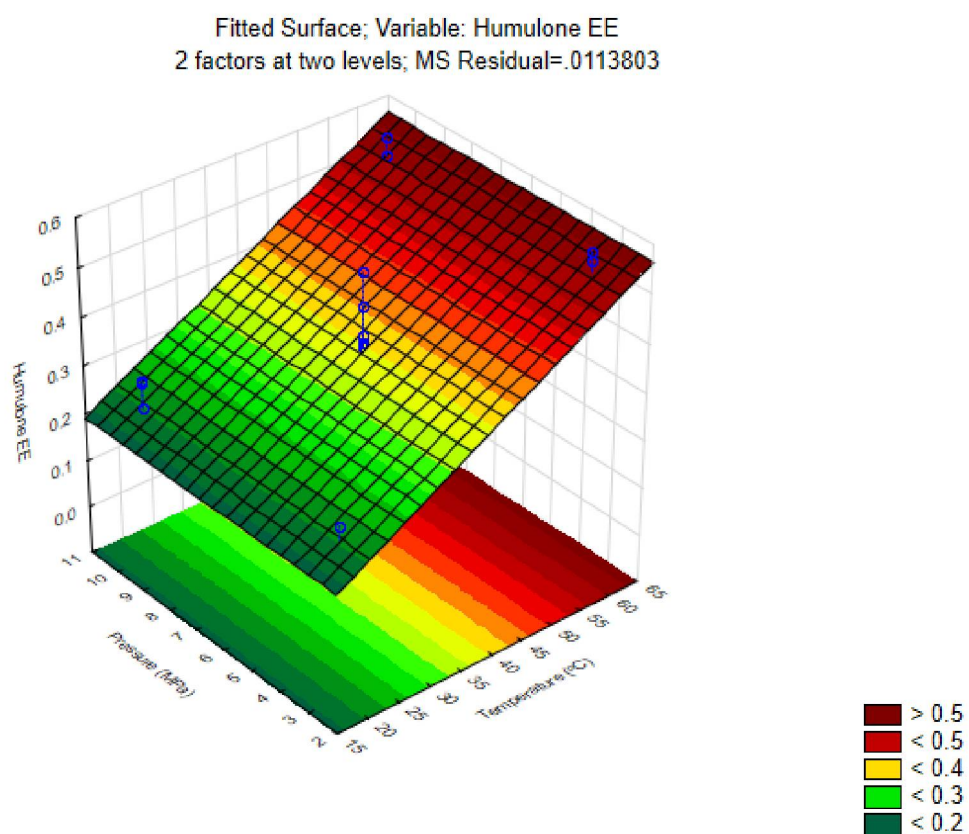
A grande afinidade desse solvente com os compostos de amargor e a seletividade em relação ao xanthohumol indica que o propano pressurizado pode ser utilizado para obtenção de extratos ricos em resinas de amargor. A redução da presença de polifenóis é positiva do ponto de vista da palatabilidade, pois reduz a sensação de adstringência no paladar humano. Extratos obtidos através da extração utilizando propano pressurizado tem grande potencial de uso como aditivo na fase quente da produção de cerveja, trazendo assim um amargor limpo e não áspero.

FIGURA 5-7 - DIGRAMA DE PARETO DOS EFEITOS SOBRE AS EE DOS ALFA ÁCIDOS (ESQUERDA) E BETA ÁCIDOS (DIREITA)



FONTE: O AUTOR.

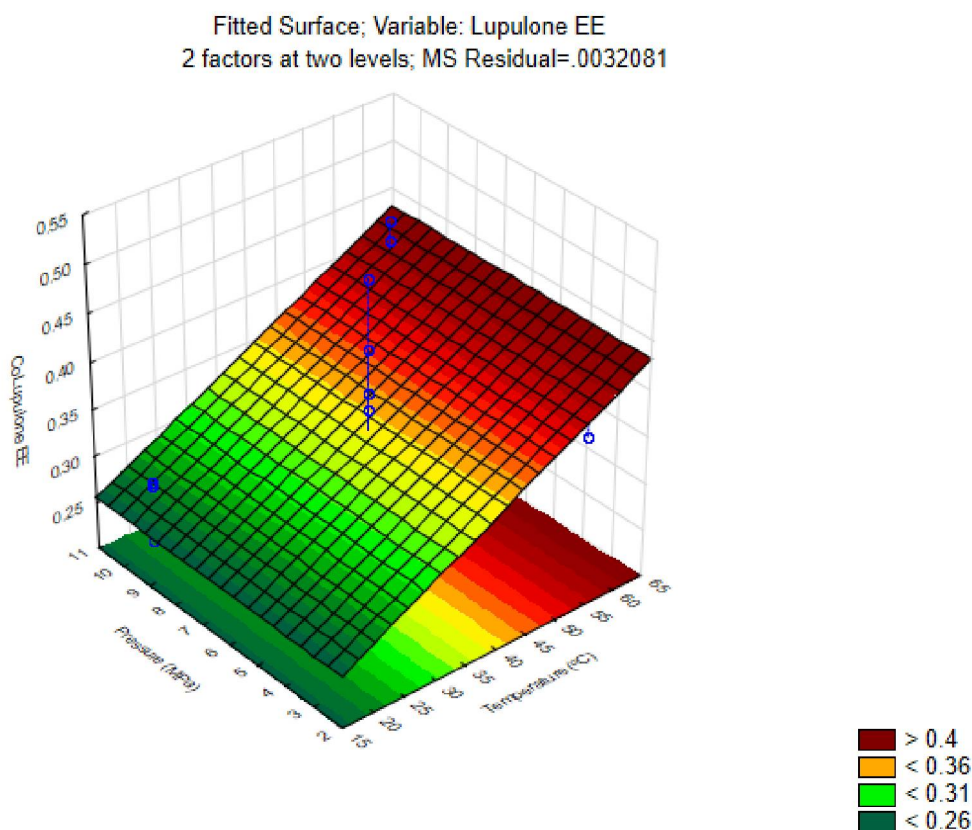
FIGURA 5-8 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A EE DA HUMULONA NAS EXTRAÇÕES UTILIZANDO PROPANO PRESSURIZADO



FONTE: O AUTOR.

$$\text{Humulona EE (\%)} = 7,801 + 0,7476 \cdot T \quad [5.5]$$

FIGURA 5-9 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA A EE DA LUPULONA NAS EXTRAÇÕES UTILIZANDO PROPANO PRESSURIZADO



FONTE: O AUTOR.

$$CoLupulona EE (\%) = 20,25 + 0,352 \cdot T \quad [5.6]$$

5.4.2.1 Extração com scCO₂ assistida por cossolvente

Extrações utilizando duas diferentes razões entre a massa de cossolvente orgânico, acetato de etila, e a massa inicial de lúpulo foram analisadas. O rendimento de extrações com scCO₂ tende a ser menor quando comparado a outras técnicas. Uma maneira de mitigar essa limitação é inserir um cossolvente orgânico, aumentando a afinidade entre a mistura solvente e os compostos fenólicos da matriz vegetal.

Os resultados serão apresentados em dois blocos, sendo o primeiro os ensaios que utilizaram a MR igual a um, ou seja, a razão entre massa de solvente no início da extração e massa de lúpulo inicial é igual a um.

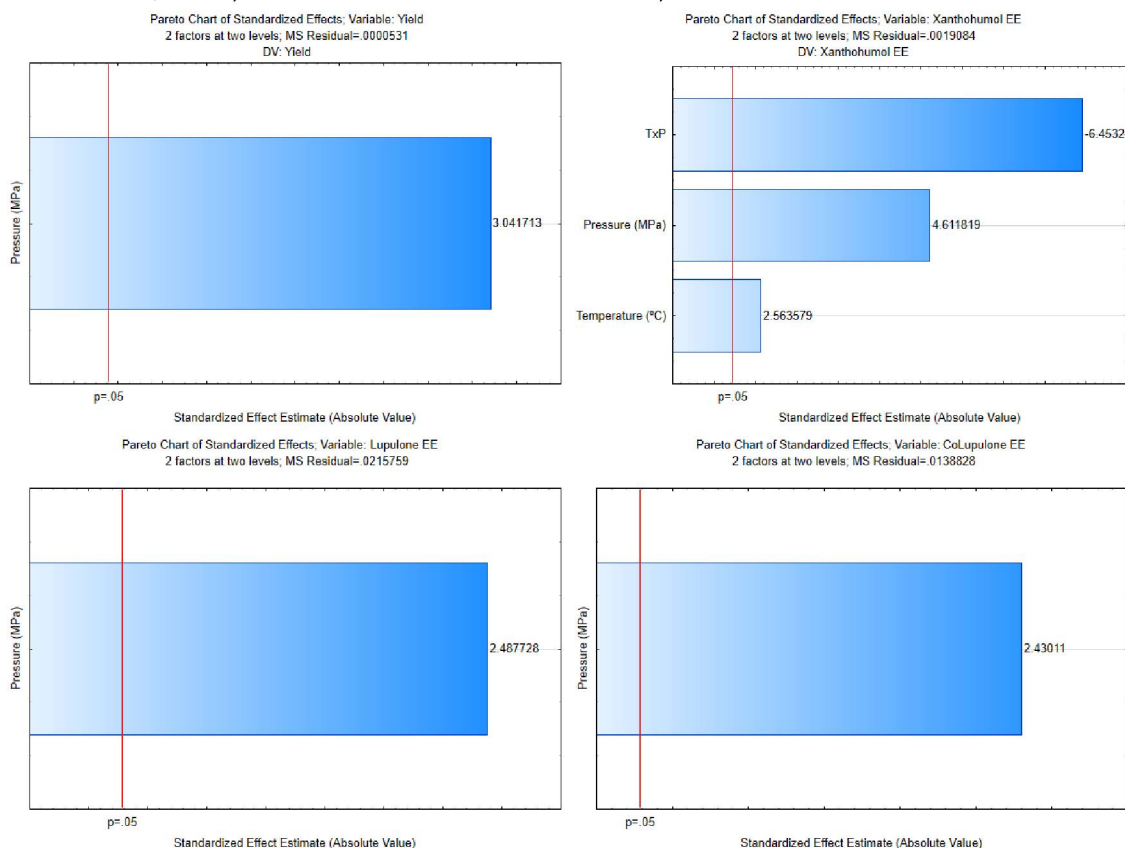
5.4.2.2 Extração com scCO₂ + EtOAc com MR = 1

O rendimento global de extração dentro das faixas avaliadas, se mostrou dependente principalmente da pressão. Sendo observado que o aumento da pressão de extração induziu em um aumento na massa de extrato obtida por grama de matriz submetida à extração.

O uso do acetato de etila nessa proporção, MR = 1, induziu a um discreto aumento do rendimento global, entretanto a composição obtida dos extratos foi distinta. O uso do cossolvente aumentou a eficiência de extração do xanthohumol em mais de 30 vezes, fazendo com que a fração molar desse composto subisse de menos de 1% para até 5,1%. Também foi observado um aumento na eficiência de extração dos alfas ácidos e um discreto decréscimo nas eficiências de extração dos betas ácidos. Dessa forma resultando em extratos que podem apresentar atividade anti-inflamatória e anticarcinogênica (VIEGAS et al., 2012). A redução na concentração das lupulonas pode favorecer o uso desses extratos nas etapas frias da produção de cerveja, como a maturação e envase.

Os diagramas de Pareto da FIGURA 5-10 demonstram os efeitos estatisticamente relevantes sobre as eficiências de extração do xanthohumol, lupulona e colupulona nos extratos analisados nesse bloco. Os demais compostos não demonstraram variação estatisticamente relevante para as faixas de temperatura e pressão utilizadas no planejamento. Fato esse que pode indicar uma baixa disponibilidade dos demais compostos, demandando um solvente mais polar para carregá-los e aumentar o rendimento de extração.

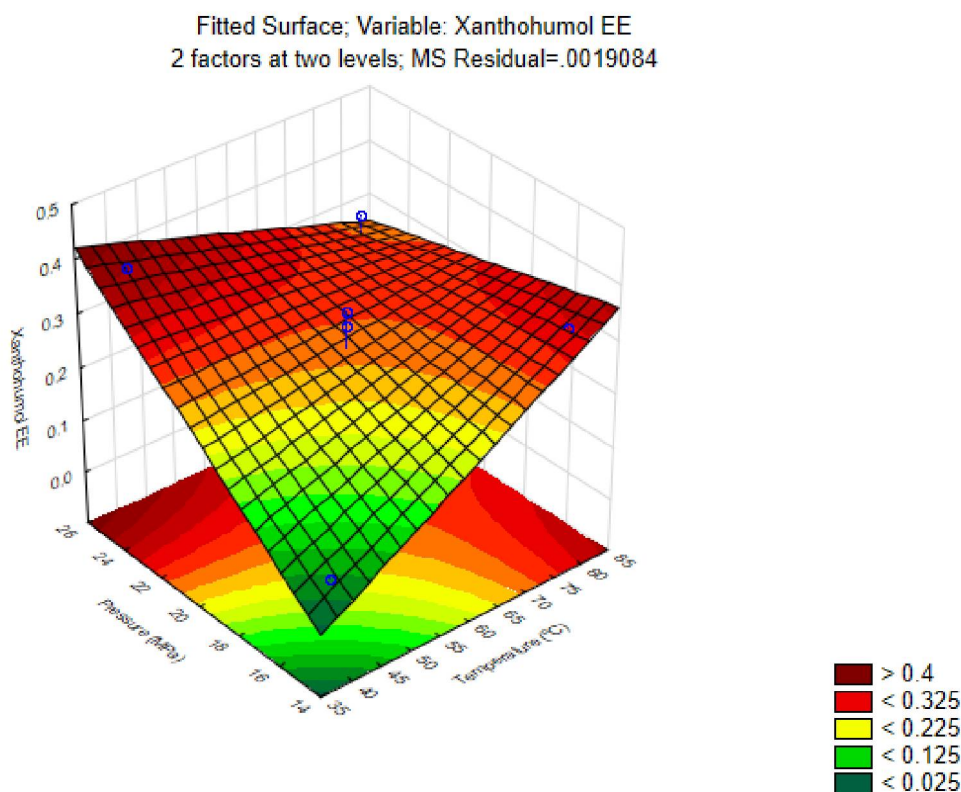
FIGURA 5-10 - EFEITOS ESTATISTICAMENTE RELEVANTES PARA A EXTRAÇÃO COM scCO_2 + ACETATO DE ETILA EM $\text{MR}=1$. CANTO SUPERIOR ESQUERDO, RENDIMENTO. CANTO SUPERIOR DIREITO XANTHOMOL. CANTO INFERIOR ESQUERDO, LUPULONA. CANTO INFERIOR DIREITO, COLUPULONA.



FONTE: O AUTOR.

Devido a importância e a afinidade da mistura de solvente (scCO_2) e cossolvente (AcOEt) com o xanthohumol, modelos de superfície de resposta foram utilizados para descrever o comportamento da eficiência de extração desse composto, FIGURA 5-11. Essas superfícies utilizam como variáveis a pressão e temperatura de extração aliados à combinação desses dois efeitos. A equação que descreve a superfície de resposta é a 5.7, onde a eficiência de extração é dada em % massa extraída / massa presente na matriz.

FIGURA 5-11 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA EE DO XANTHOMOL OBTIDA PELA EXTRAÇÃO UTILIZANDO UMA MISTURA DE scCO₂ + ACETATO DE ETILA EM MR=1



FORNE: O AUTOR.

$$\text{Xanthohumol EE (\%)} = -11,23 + 1,895 \cdot T + 6,404 \cdot P + 0,0862 \cdot T \cdot P \quad [5.7]$$

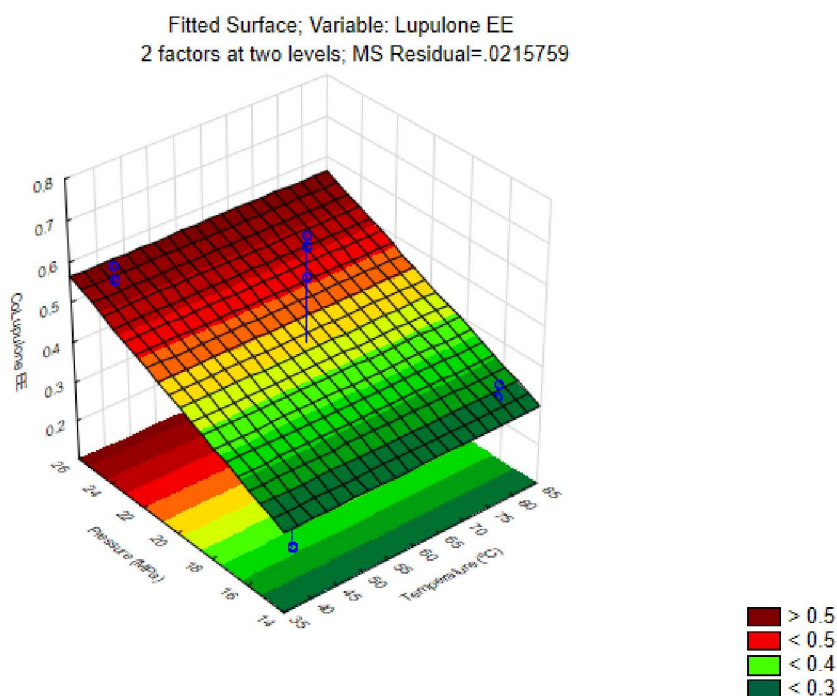
Dessa maneira, fica claro que melhor maneira de se obter xanthohumol através da extração contínua em leito fixo é empregando cossolvente em altas pressões. Uma faixa mais ampla de pressões deve ser explorada a fim de otimizar ainda mais esse processo, que é promissor do ponto de vista de obtenção de extratos ativos a partir de fontes naturais.

A eficiência de extração de todos os alfas ácidos se mostrou pouco sensível a variação de temperatura e pressão dentro dos intervalos estudados. Tornando assim dispensável a tentativa de propor correlações entre a eficiência de extração desses compostos e as variáveis temperatura e pressão. A variação da composição da mistura de solvente pode ter maior impacto nessa faixa de temperatura e pressão.

Já os betas ácidos lupulona e colupulona apresentaram maior sensibilidade a variação de pressão e sendo a eficiência de extração de ambos diretamente proporcional ao aumento da pressão de extração. A fim de entender melhor esse comportamento uma superfície de

resposta que correlaciona a EE da lupulona com temperatura e pressão foi construída, FIGURA 5-12. A equação 5.8 descreve o comportamento da superfície de resposta da EE em função de temperatura e pressão.

FIGURA 5-12 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA EE DA LUPULONA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO UTILIZANDO UMA MISTURA DE scCO₂ + ACETATO DE ETILA EM MR=1



FONTE: O AUTOR.

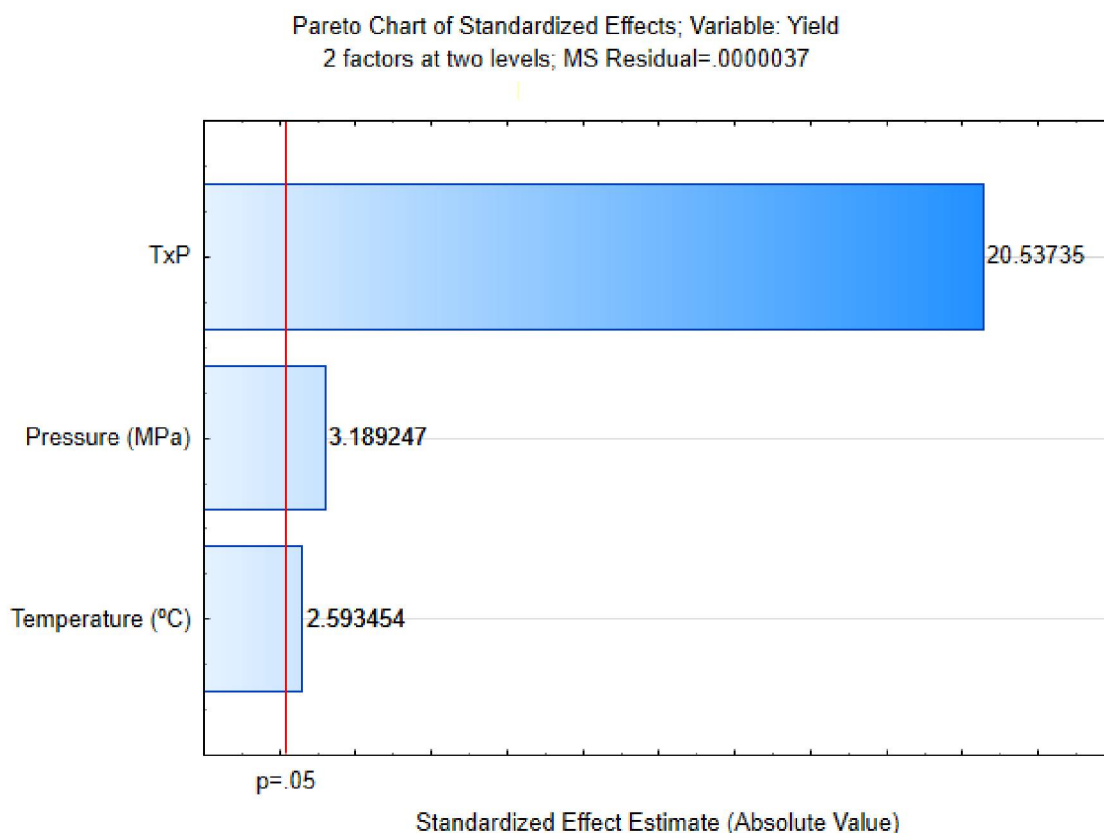
$$CoLupulona EE (\%) = -1,159 + 2,210 \cdot P \quad [5.8]$$

5.4.2.3 Extração com scCO₂ + EtOAc com MR=2

Para esse método de extração o aumento na proporção de massa de solvente para massa de matriz vegetal induz a um aumento no rendimento global. Os maiores rendimento globais foram obtidos em MR igual a 2. Tanto a temperatura quanto a pressão apresentaram efeitos positivos sobre o rendimento de extração, porém o maior impacto foi proveniente da combinação dos efeitos de temperatura e pressão. Logo, o aumento de ambas essas variáveis

induziu a um aumento da massa de extrato obtida para uma mesma massa de matriz inicial. Um diagrama de Pareto ilustra esses efeitos na FIGURA 5-13.

FIGURA 5-13 - EFEITOS DE TEMPERATURA, PRESSÃO E SUA COMBINAÇÃO SOBRE O RENDIMENTO GLOBAL DE EXTRAÇÃO PARA AS EXTRAÇÕES REALIZADAS COM scCO_2 + ACETATO DE ETILA MR=2



FONTE: O AUTOR.

O aumento na MR do cossolvente resultou nas maiores EE do xanthohumol e por consequências as maiores frações molares desse composto nos extratos obtidos. Confirmando a tendência já observada no bloco anterior de extrações. Novamente a adição de um solvente polar favoreceu a extração do principal composto fenólico do lúpulo. Novas proporções de acetato de etila podem ser utilizadas visando otimizar a extração de xanthohumol. As EE dos alfas ácidos também foram as mais altas nesse planejamento. Já as EE dos betas ácidos apresentaram maior dependência das condições de extração (ASEP et al., 2013).

Todos os efeitos estaticamente relevantes sobre as EE podem ser observados nos diagramas de Pareto compilados na FIGURA 5-14. O efeito predominante para as EE de todos

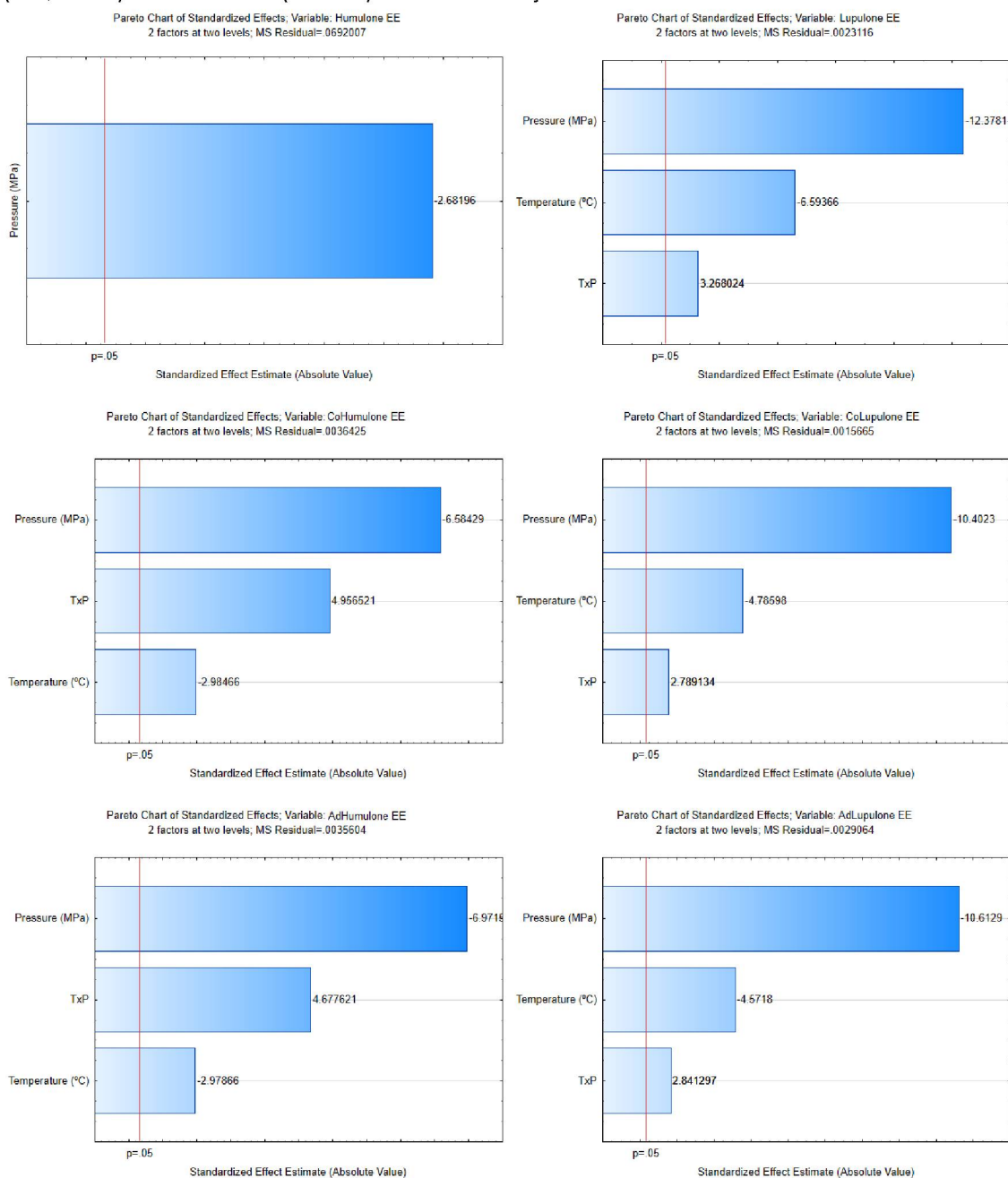
os compostos de amargor do lúpulo, alfa beta ácidos, é a pressão. Sendo que o efeito dessa variável sobre as EE é negativo, ou seja, o incremento da pressão induz a redução na eficiência de extração dos compostos de amargor. Esse resultado à primeira vista é contraintuitivo, pois a pressão tem um efeito positivo sobre o rendimento global da extração.

Uma explicação possível é que em maiores pressões a densidade do solvente tenderia a aumentar, sendo um efeito que dificulta o carreamento de compostos de maior densidade. Fato esse que pode reduzir a seletividade da mistura de solvente e cossolvente em relação aos sete compostos quantificados. Dessa maneira o rendimento global aumenta, em contrapartida o extrato obtido passa a ser composto por muitos outros produtos. Cabe mais estudos sobre quais seriam os compostos que passaram a fazer parte dos extratos de lúpulo obtidos nesse planejamento.

A mesma tendência foi observada para as EE dos compostos de amargor em relação à variação de temperatura. O aumento da temperatura desfavoreceu a EE dos alfas e betas ácidos de maneira análoga a pressão. Nesse ponto podemos creditar essa redução a solubilidade desses compostos em maior temperatura e aumento da interação da mistura de solvente mais cossolvente com moléculas mais polares. Nessa competição os compostos de menor massa molecular são mais facilmente solvatados e carregados para a fase do solvente do que os compostos de amargor.

Um estudo aprofundado desse sistema auxiliaria a encontrar as melhores condições para obtenção de compostos de amargor, fenólicos e de aroma. Mesmo assim é possível afirmar que o uso do acetato de etila resultou em extratos ricos em compostos de amargor e xanthohumol, ao mesmo tempo que aumentou consideravelmente o rendimento global de extração.

FIGURA 5-14 - EFEITOS DE TEMPERATURA, PRESSÃO E SUA COMBINAÇÃO SOBRE AS EE DOS ALFA ÁCIDOS (ESQUERDA) E BETA ÁCIDOS (DIREITA) PARA AS EXTRAÇÕES REALIZADAS COM scCO_2 + ACETATO DE ETILA MR=2

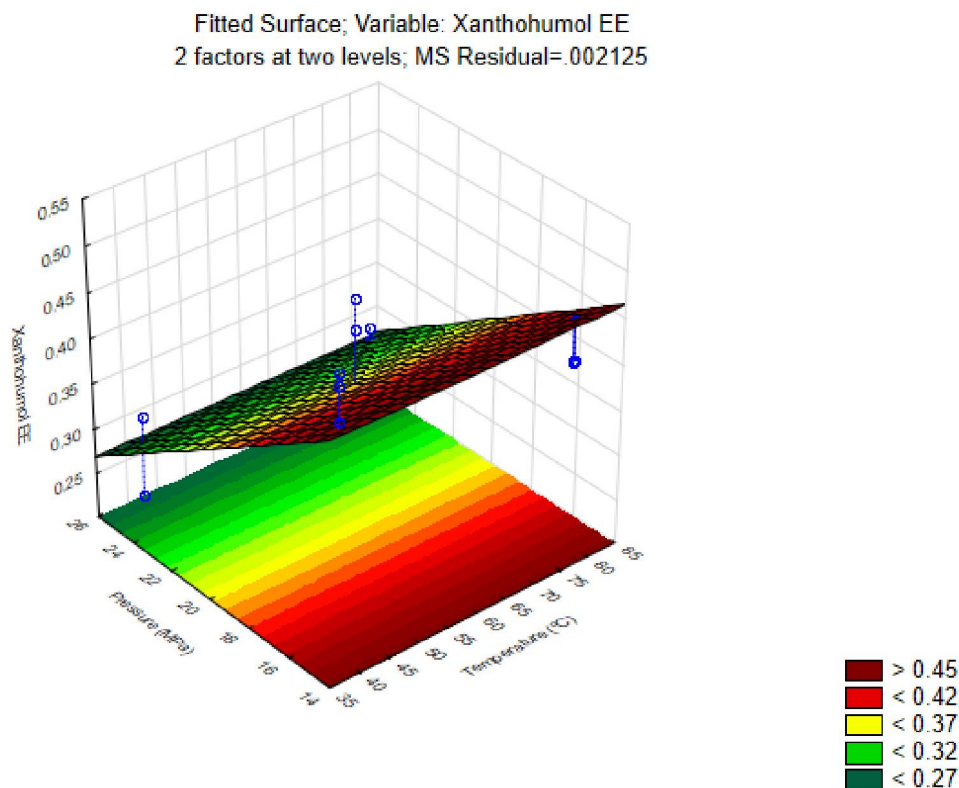


FONTE: O AUTOR.

Superfícies de resposta foram construídas para ilustrar o comportamento da eficiência de extração do xanthohumol, dos alfa ácidos – representados pela cohumulona – e dos beta ácidos – representados pela lupulona – em função das variáveis temperatura e pressão. A FIGURA 5-15 demonstra que o aumento da pressão reduziu a quantidade de xanthohumol

extraído por massa inicial de lúpulo no leito fixo. A equação 5.9 representa o modelo de superfície de resposta desse composto.

FIGURA 5-15 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA EE DO XANTHOMOL PARA AS EXTRAÇÕES REALIZADAS COM scCO₂ + ACETATO DE ETILA MR=2



FONTE: O AUTOR.

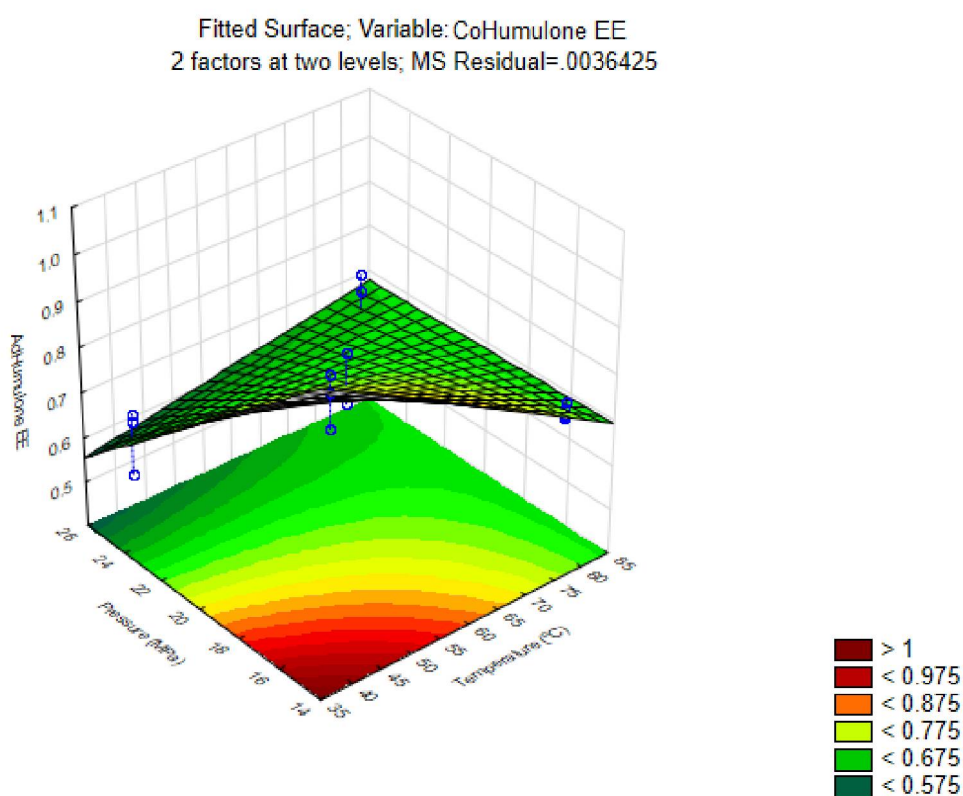
$$Xanthohumol\ EE\ (\%) = 69,55 - 1,641 \cdot P \quad [5.9]$$

Já para os alfas ácidos a pressão e temperatura apresentam efeitos negativos, sendo a pressão o efeito mais importante estatisticamente. A superfície de resposta da cohumulona é apresentada na FIGURA 5-16 e seu modelo na equação 5.10. A melhor condição de eficiência de extração dos alfas ácidos foi encontrada na menor temperatura e menor pressão, condições em que o efeito do cossolvente é predominante em relação ao scCO₂. Como a mistura está a estado subcrítico a em maiores temperatura e pressão a viscosidade da fase móvel (solvente + cossolvente) tende a ser maior dificultando a transferência de massa pela formação de uma interface do tipo filme entre a matriz vegetal e o a mistura solvente mais

cossolvente (ARAÚJO, Micheli Nolasco et al., 2019; COELHO, Renata et al., 2016; TREVISANI JUCHEN et al., 2019).

Comportamento análogo foi observado na eficiência de extração dos beta ácidos, aqui representados pela superfície de resposta construída para a lupulona, FIGURA 5-17. O modelo matemático da superfície de resposta, equação 5.11, também aponta para um máximo de EE na menor temperatura e menor pressão avaliadas no planejamento. Os motivos para tal são os mesmos já discutidos acima, o aumento da pressão e temperatura acabam por reduzir os coeficientes de difusão e convecção mássica.

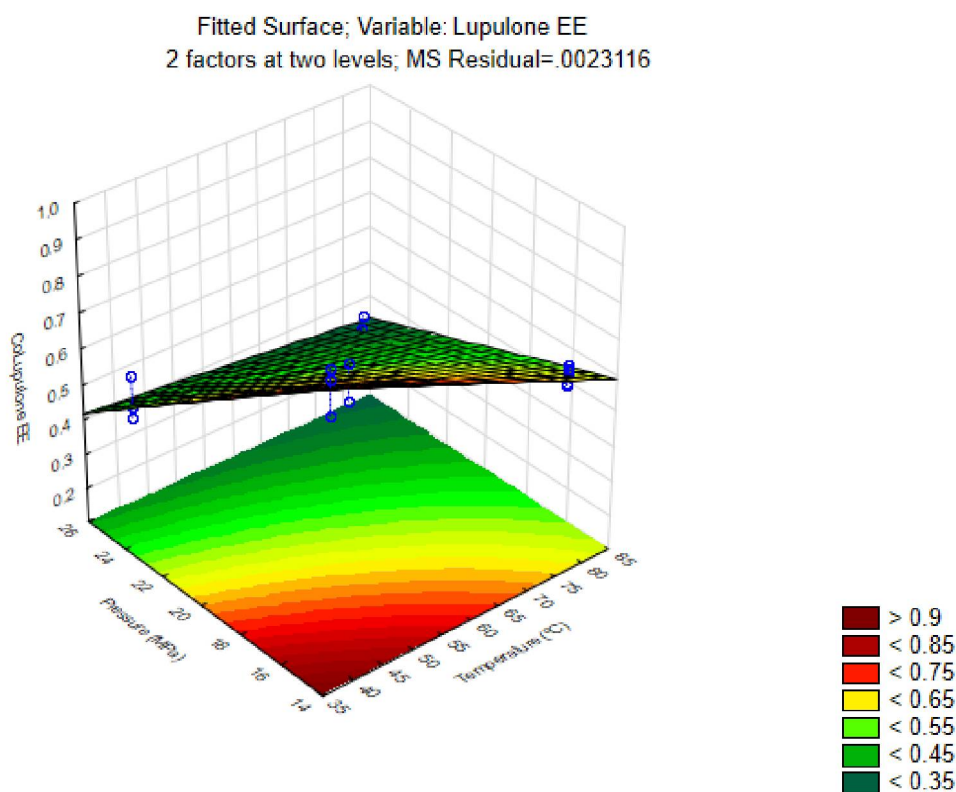
FIGURA 5-16 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA EE DA COHUMULONA PARA AS EXTRAÇÕES REALIZADAS COM scCO₂ + ACETATO DE ETILA MR=2



FONTE: O AUTOR.

$$\text{CoHumulona EE (\%)} = 223,7 - 1,745 \cdot T - 6,760 \cdot P + 0,0753 \cdot T \cdot P \quad [5.10]$$

FIGURA 5-17 - SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA EE DA LUPULONA PARA AS EXTRAÇÕES REALIZADAS COM scCO₂ + ACETATO DE ETILA MR=2



FONTE: O AUTOR.

$$CoLupulona EE (\%) = 197,4 - 1,274 \cdot T - 5,752 \cdot P + 0,0424 \cdot T \cdot P \quad [5.11]$$

Nesse trabalho a técnica de HPLC foi utilizada para identificar e avaliar extratos obtidos por técnicas que utilizaram solventes pressurizados, como o scCO₂, o propano pressurizado e a mistura pressurizada de acetato de etila mais scCO₂. Os sete compostos selecionados, três alfa ácidos (Humulona, cohumulona e adhumulona), três beta ácidos (Lupulona, colupulona e adlupulona) e o Xanthohumol representaram a maior parte dos extratos. Sendo que nos extratos obtidos apenas por scCO₂ os sete compostos representavam de 93,6 a 98,9 % da massa obtida na extração. Já para o propano pressurizado os compostos quantificados representavam de 54,4 a 80,8 % da massa dos extratos. Finalmente para as extrações utilizando cossolvente os compostos quantificados correspondem a faixa de 53,0 a 99,0 % da massa obtida na extração. Esses resultados mostram a alta seletividade do scCO₂ e a

possibilidade de aumento da eficiência de extração pelo uso do acetato de etila como cossolvente.

Cabe agora um maior aprofundamento na seleção das condições de temperatura e pressão de extração, além da otimização da MR entre cossolvente e massa inicial de lúpulo no leito.

5.5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra uma visão geral do comportamento de extração dos sete compostos mais abundantes no lúpulo e ajudam a nortear novas abordagens que envolvam tanto essa matriz como esses solventes e cossolventes, tanto em estado subcrítico, quanto no estado supercrítico.

Os diferentes sistemas geraram extratos com composições distintas que podem vir a ser utilizados tanto na indústria de alimentos quanto na indústria farmacêutica. Os extratos de lúpulo obtidos pela extração supercrítica por CO₂ tende a ser ótimas fontes de compostos de amargor e aroma. Já os extratos obtidos pelo propano pressurizado apresentaram aromas mais florais e frutados e eram ricos principalmente em alfa ácidos, podendo ser utilizados como aromatizantes ou aditivos de correção de amargor na cerveja. Finalmente os extratos obtidos pela mistura subcrítica de CO₂ supercrítico mais acetato de etila apresentaram um grande potencial de extração de xanthohumol, composto esse de grande interesse para a indústria farmacêutica e com reconhecidas atividades antioxidante, anti-inflamatória e anticarcinogênica.

A composição do lúpulo brasileiro indica que essa matriz é comparável a lúpulos já reconhecidos. Em que a concentração total de compostos de amargor é comparável aos lúpulos nobres da República Tcheca e os versáteis ingleses. A concentração de óleos essenciais é típica de lúpulos norte-americanos utilizados para sabor e aroma e a concentração de xanthohumol o torna uma matriz promissora para obtenção de extratos ricos em compostos bioativos.

As diferentes metodologias de extração se mostraram úteis em diferentes aplicações. Os extratos provenientes do uso do propano pressurizado, foram altamente seletivos para obtenção de extratos ricos em compostos de amargor livres de compostos fenólicos. Já os

extratos obtidos pelo scCO₂ foram eficientes em extrair os compostos de amargor e relativamente eficientes para extração do xanthohumol. Já os extratos utilizando a mistura de scCO₂ e acetato de etila apresentaram alta eficiência de extração para os alfas ácidos e xanthohumol sendo ótimos para a produção de cerveja com amargor mais limpo e menos adstringente.

O principal efeito nas extrações subcríticas é a pressão. Os pontos ótimos sempre tendem a menores pressões devido a menor viscosidade da mistura ou solvente utilizado como carreador. Já para as extrações supercríticas os principais efeitos são ora pressão, ora temperatura. Entretanto é possível perceber um maior peso no efeito pressão. Os pontos ótimos são encontrados em maiores pressões devido ao aumento do poder de solvatação do scCO₂ sem o aumento da viscosidade.

5.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E SUGESTÃO DE ESTUDOS FUTUROS

Conforme o avanço desse estudo da variedade brasileira de lúpulo, o lúpulo Mantiqueira, evidenciou-se a importância de valorizar matrizes vegetais nacionais. Como é possível observar nos resultados de atividade antioxidante e de composição do lúpulo, percebe-se que é indispensável fomentar o incremento na área de plantio dessa matriz. Induzindo a um rápido crescimento do mercado brasileiro gerando impacto positivo na economia local e nacional.

Diferentes técnicas de extração não convencional foram aplicadas ao lúpulo brasileiro nesse estudo. Nas extrações com cossolvente acetato de etila o rendimento global de extração aumentou, assim como a velocidade e a eficiência de extração. As melhores condições de extração com cossolvente foram as de maior temperatura e pressão, 80 °C e 25 MPa, com rendimentos variando de 10,14 a 10,52 % em massa. Confirmando a tendência do aumento de transferência de massa devido a combinação dos fatores positivos de temperatura e pressão. Esses mesmos extratos apresentaram níveis de TPC e TFC análogos aos encontrados nas extrações utilizando apenas scCO₂.

Todas as condições de extração e combinações de solvente e cossolvente resultaram em extratos com atividade antioxidante alta. Fazendo com que essa matriz seja de interesse para obtenção de compostos antioxidantes.

O acetato de etila além de aumentar o rendimento de extração teve um efeito seletivo positivo para extração de compostos fenólicos. Esse solvente, que pode ser obtido através de rotas verdes, demonstrou-se promissor como uma alternativa ao tradicional etanol nas extrações que utilizam o scCO_2 combinado a um cossolvente.

A metodologia proposta por esse estudo demonstrou-se competente em quantificar sete diferentes compostos com boa precisão devido a separação adequada dos picos e boa definição dos mesmos. Tendo um tempo médio de injeção menor que outros métodos avaliados durante o desenvolvimento. Destaca-se a possibilidade de quantificar separadamente cada um dos 6 principais ácidos e ainda o xanthohumol em uma única análise.

Na etapa de caracterização das amostras foi possível identificar e quantificar extratos em quase a totalidade dos extratos, pois as três variações tanto dos alfa ácidos, quanto dos beta ácidos combinados ao xanthohumol representam a maior fração das amostras. Nos extratos obtidos apenas por scCO_2 os sete compostos representavam de 93,6 a 98,9 % da massa obtida na extração. Para as extrações com propano e assistidas por cossolvente esses sete compostos nunca representaram menos de 50% da massa dos extratos e em determinadas condições correspondiam a até 99% da composição da amostra.

Os extratos obtidos com scCO_2 puro apresentaram altíssima seletividade para os compostos de amargor, conforme o esperado. Já os obtidos com a combinação do acetato de etila com scCO_2 mantiveram o poder de extração dos compostos de amargor, porém a eficiência de extração de xanthohumol foi muito alta. Nos extratos obtidos utilizando apenas o propano pressurizado o xanthohumol não foi encontrado em concentrações consideráveis.

Com relação a composição do lúpulo Mantiqueira, é possível afirmar que ele tem a composição comparável a variedades de ampla utilização na indústria cervejeira e ainda apresenta características sensoriais análogas a lúpulos provenientes da América do Norte.

Esse trabalho apresenta que tanto a matriz quanto as técnicas utilizadas são promissoras e devem ser ainda estudadas de maneira mais profunda para otimização de condições de extração por tipo de componente.

Novos trabalhos aplicando as técnicas de extração com propano pressurizado e de scCO₂ mais acetato de etila como cossolvente devem ser aplicadas a diferentes matrizes visando obter extratos de alta concentração de compostos fenólicos. Uma linha de estudo seria a utilização dessas técnicas de extração em resíduos provenientes da indústria cervejeira, como o lúpulo descartado após a técnica de dry hopping, extração a frio na maturação.

Novos estudos utilizando variações de métodos analíticos de HPLC podem quantificar ainda diferentes compostos obtidos na extração com propano pressurizado.

A aplicação de CG pode ajudar a estratificar os principais compostos responsáveis pelas características sensoriais do lúpulo Mantiqueira.

CAPÍTULO 6 REFERÊNCIAS

- (AHA), Working group of Hop Analysis. **International Calibration Extract 3 (ICE-3)**. Zürich: [s.n.], 2010. Disponível em: <www.laborveritas.ch>.
- ALGAZZALI, VICTOR; SHELLHAMMER, Thomas. Bitterness Intensity of Oxidized Hop Acids: Humulinones and Hulupones. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 74, n. 1, p. 36–43, 2016.
- ALLEN, Samuel J.; OTT, Lisa S. HPLC method for rapidly following biodiesel fuel transesterification reaction progress using a core-shell column. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 404, n. 1, p. 267–272, 20 jul. 2012. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00216-012-6094-4>>.
- ANVISA-BRASIL. Decreto nº 50040, de janeiro de 1961. **Anvisa**, 1961.
- ARAÚJO, Júlio Maria A. **Química de Alimentos - Teoria e Prática**. 5. ed. Viçosa: UFV, 2011.
- ARAÚJO, MICHELI NOLASCO et al. Enhanced extraction of spent coffee grounds oil using high-pressure CO₂ plus ethanol solvents. **Industrial Crops and Products**, v. 141, n. August, p. 111723, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111723>>.
- ASEP, E.K. et al. Effects of polar cosolvents on cocoa butter extraction using supercritical carbon dioxide. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 20, p. 152–160, 1 out. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856413001070>>. Acesso em: 17 fev. 2019.
- AZEVEDO, A. B. A.de et al. Extraction of caffeine, chlorogenic acids and lipids from green coffee beans using supercritical carbon dioxide and co-solvents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, n. 3, p. 543–552, set. 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322008000300012&lng=en&tlng=en>.
- BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643, ago. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000400013&lng=pt&tlng=pt>.
- BAŞER, K.H; BUCHBAUER, G. Handbook of Essential oils: Science, Technology, and

Applications. **Handbook Essential Oils - Sci. Technol. Appl.** [S.l: s.n.], 2010. p. 953.

BESSADA, Sílvia M.F. et al. Phenolic profile and antioxidant activity of *Coleostephus myconis* (L.) Rchb.f.: An underexploited and highly disseminated species. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 45–51, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.04.065>>.

BHALE, S.D. et al. Oregano and Rosemary Extracts Inhibit Oxidation of Long-Chain n-3 Fatty Acids in Menhaden Oil. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. C504–C508, nov. 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2007.00569.x>>.

BIENDL, Martin. Hops and Health. **Technical Quarterly**, v. 46, 2009. Disponível em: <<http://www.mbaa.com/publications/tq/tqPastIssues/2009/Abstracts/TQ-46-2-0416-01.htm>>.

BIPARVA, Pourya; EHSANI, Mahjoobeh; HADJMOHAMMADI, Mohammad Reza. Dispersive liquid–liquid microextraction using extraction solvents lighter than water combined with high performance liquid chromatography for determination of synthetic antioxidants in fruit juice samples. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 27, n. 1, p. 87–94, 1 ago. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0889157512000737>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

BLAND, Jeffrey S. et al. Isohumulones from hops (*Humulus lupulus*) and their potential role in medical nutrition therapy. **PharmaNutrition**, v. 3, n. 2, p. 46–52, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2015.03.001>>.

BOCQUET, L. et al. *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, 1 out. 2018.

BOCQUET, Laetitia et al. Antifungal activity of hop extracts and compounds against the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. **Industrial Crops and Products**, v. 122, n. May, p. 290–297, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.05.061>>.

BOWE, James et al. The hop phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, reverses the ovariectomy-induced rise in skin temperature in an animal model of menopausal hot flashes. **Journal of Endocrinology**, v. 191, n. 2, p. 399–405, nov. 2006. Disponível em: <<https://joe.bioscientifica.com/view/journals/joe/191/2/1910399.xml>>.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate

antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1 jan. 1995. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

BRAVO, Laura. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 27 abr. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-lookup/doi/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>>.

BRUNNER, Gerd. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, n. 1–2, p. 21–33, 1 mar. 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877404003383>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

CAI, Yizhong et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, n. 17, p. 2157–2184, 12 mar. 2004. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320503011457>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

CARDOZO, Euclides Lara et al. Selective Liquid CO₂ Extraction of Purine Alkaloids in Different *Ilex paraguariensis* Progenies Grown under Environmental Influences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 6835–6841, ago. 2007. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0706225>>.

CARERI, M. et al. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina Pacifica* algae: A chemometric approach. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 1, p. 61–71, 2001.

CARRILHO, Emanuel et al. Fluidos supercríticos em química analítica. v. 24, n. 4, p. 509–515, 2001.

CHADWIEK, Lucas R. et al. Estrogens and congeners from spent hops (*Humulus lupulus*). **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2024–2032, 2004.

CHEN, C. Y.Oliver; BLUMBERG, Jeffrey B. **Flavonoids in beer and their potential benefit on the risk of cardiovascular disease**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00084-5>>.

COELHO, José et al. Extraction and bioprocessing with supercritical fluids. **Physical Sciences**

Reviews, v. 5, n. 9, 26 maio 2020. Disponível em:

<<https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/psr-2018-0069/html>>.

COELHO, Renata et al. Extraction of Kiwifruit Seed (*Actinidia Deliciosa*) Oil Using Compressed Propane. **Journal of Food Process Engineering**, v. 39, n. 4, p. 335–344, 2016.

CORREA, Madeline et al. Bioactivity of extracts of *Musa paradisiaca* L. obtained with compressed propane and supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 122, p. 63–69, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.12.004>>.

_____. Extraction of inflorescences of *Musa paradisiaca* L. using supercritical CO₂ and compressed propane. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 113, p. 128–135, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.03.016>>.

_____. Extraction of inflorescences of *Musa paradisiaca* L. using supercritical CO₂ and compressed propane. **Advances in Accounting**, v. 42, p. I–VIII, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.03.016>>.

COSTA, Patrícia et al. Cyclodextrins enhance the antioxidant activity of essential oils from three Lamiaceae species. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 341–346, 1 ago. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669015002551>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

CZAIKOSKI, Karina et al. Kinetics, composition and biological activity of *Eupatorium* intermedium flower extracts obtained from scCO₂ and compressed propane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 97, p. 145–153, 1 fev. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844614003441>>. Acesso em: 12 fev. 2019.

DA PORTO, Carla; DECORTI, Deborha; NATOLINO, Andrea. Water and ethanol as co-solvent in supercritical fluid extraction of proanthocyanidins from grape marc: A comparison and a proposal. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 87, p. 1–8, 1 mar. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844613004233>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L.; FENNEMA, Owen R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. Ed. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DANLAMI, Jibrin Mohammed et al. A comparative study of various oil extraction techniques from plants. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 30, n. 6, 1 jan. 2014. Disponível em:

<<https://www.degruyter.com/view/j/revce.2014.30.issue-6/revce-2013-0038/revce-2013-0038.xml>>.

DOLATABADI, Jafar Ezzati Nazhad; KASHANIAN, Soheila. A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1223–1230, 1 jun. 2010. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996910001250>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

EDWARDSON, John R. Hops : Their Botany , History , Production and Utilization Published by : Springer on behalf of New York Botanical Garden Press Stable URL :

<https://www.jstor.org/stable/4252069> Hops-Their Botany , History , Production and Utilization. v. 6, n. 2, p. 160–175, 1952.

EMBUSCADO, Milda E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review.

Journal of Functional Foods, v. 18, p. 811–819, 1 out. 2015. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615001127>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

FETZER, Damian L. et al. Extraction of baru (*Dipteryx alata* vogel) seed oil using compressed solvents technology. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, n. January, p. 23–33, 2018.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.004>>.

FORNARI, Tiziana. **Supercritical CO2 Extraction: Relevance to Food Processing**. [S.l.]:

Elsevier, 2016. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081005965031115>>.

GERHÄUSER, Clarissa. **Phenolic beer compounds to prevent cancer**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2008.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00068-7>>.

GOIRIS, Koen et al. The Flavoring Potential of Hop Polyphenols in Beer. 2014.

GUEDES, Amanda Roman et al. Extraction of citronella grass solutes with supercritical CO₂, compressed propane and ethanol as cosolvent: Kinetics modeling and total phenolic assessment. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 137, n. January, p. 16–22, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2018.03.003>>.

_____. Extraction of *Synadenium grantii* Hook f. using conventional solvents and supercritical CO₂ + ethanol. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 160, p. 8–10, 2020.

GUO, Qing et al. Antioxidant efficacy of rosemary ethanol extract in palm oil during frying

and accelerated storage. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 82–88, 30 dez. 2016.

Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669016305374>>.

Acesso em: 17 fev. 2019.

HALLIWELL, Barry. Antioxidant characterization: Methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 49, n. 10, p. 1341–1348, 17 maio 1995. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000629529500088H>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

HARRIS, Daniel C. **QUANTITATIVE CHEMICAL ANALYSIS**. 10th. ed. China Lake, California: Clancy Marshall, 2010. Disponível em: <<http://www.whfreeman.com/>>.

HE, Guo-qing et al. Optimization of conditions for supercritical fluid extraction of flavonoids from hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of Zhejiang University SCIENCE**, v. 6B, n. 10, p. 999–1004, 2005. Disponível em:

<<http://www.zju.edu.cn/jzus/article.php?doi=10.1631/jzus.2005.B0999>>.

HERRERO, M; CIFUENTES, A; IBANEZ, E. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgaeA review. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 136–148, 2006. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814605004772>>.

HINNEBURG, Iris; DAMIEN DORMAN, H.J.; HILTUNEN, Raimo. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 122–129, 1 jul. 2006. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605002840>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

HOU, W.-C. et al. Free radical-scavenging activity of Taiwanese native plants. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2–3, p. 170–175, 1 jan. 2003. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711304702111>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

INIGUEZ, Alejandro Bravo; ZHU, Mei Jun. Hop bioactive compounds in prevention of nutrition-related noncommunicable diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 11, p. 1900–1913, 2021. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1767537>>.

JIANG, Jiang et al. Inhibition of Lipid Oxidation and Rancidity in Precooked Pork Patties by

Radical-Scavenging Licorice (*Glycyrrhiza glabra*) Extract. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 11, p. C1686–C1694, nov. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.12273>>.

KELLNER, V. et al. Some phenolic compounds in Czech hops and beer of Pilsner type. **BrewingScience**, v. 60, n. 1–2, p. 32–37, 2007.

KESZEI, Andras; BRUBAKER, Curt L.; FOLEY, William. J. A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. **Australian Journal of Botany**, v. 56, n. 3, p. 197, 2008. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=BT07146>>.

KNEZ, Ž. et al. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235–243, 1 dez. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360544214008664>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

KOPCAK, Uiram; MOHAMED, Rahoma Sadeg. Caffeine solubility in supercritical carbon dioxide/co-solvent mixtures. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 2, p. 209–214, 1 jun. 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844604002931>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

KORBECKA-GLINKA, Grazyna; SKOMRA, Urszula; OLSZAK-PRZYBYS, Hanna. Cultivar identification in dry hop cones and pellets using microsatellite loci. **European Food Research and Technology**, v. 242, n. 9, p. 1599–1605, 2016.

KRISHNAIAH, Duduku; SARBATLY, Rosalam; NITHYANANDAM, Rajesh. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, 1 jul. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308510000520>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

KUPSKI, Sérgio Carlos et al. Mathematical modeling of supercritical CO₂ extraction of hops (*Humulus lupulus* L.). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, n. June, p. 347–356, dez. 2017a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.011>>.

_____. Mathematical modeling of supercritical CO₂ extraction of hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of Supercritical Fluids**, v. 130, n. June, p. 347–356, 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2017.06.011>>.

LAFONTAINE, Scott et al. Impact of harvest maturity on the aroma characteristics and chemistry of Cascade hops used for dry-hopping. **Food Chemistry**, v. 278, n. September 2018, p. 228–239, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.148>>.

LANGEZAAL, Carlos R. et al. Analysis of supercritical carbon dioxide extracts from cones and leaves of a *Humulus lupulus* L cultivar. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 53, n. 4, p. 455–463, 1990.

LANZA, M. et al. Phase behavior of castor oil in compressed propane and n-butane. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 2, p. 215–221, 1 jun. 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844604002943>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

LEE, Jung Chul et al. Humulone inhibits phorbol ester-induced COX-2 expression in mouse skin by blocking activation of NF- κ B and AP-1: I κ B kinase and c-Jun-N-terminal kinase as respective potential upstream targets. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 7, p. 1491–1498, 2007.

LIU, Yixuan; WANG, Ming-Wei. Botanical drugs: Challenges and opportunities: Contribution to Linnaeus Memorial Symposium 2007. **Life Sciences**, v. 82, n. 9–10, p. 445–449, 27 fev. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320507008417>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

LUPINACCI, Elvira et al. Xanthohumol from hop (*Humulus lupulus* L.) Is an efficient inhibitor of monocyte chemoattractant protein-1 and tumor necrosis factor- α release in LPS-Stimulated RAW 264.7 mouse macrophages and U937 human monocytes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 16, p. 7274–7281, 2009.

LUQUE DE CASTRO, M.D.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 16 abr. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967309016884>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

LUQUE DE CASTRO, M.D; GARCÍA-AYUSO, L.E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1–2, p. 1–10, 10 ago. 1998. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267098002335>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

LUZAK, Boguslaw et al. Extract from spent hop (*Humulus lupulus* L.) reduces blood platelet aggregation and improves anticoagulant activity of human endothelial cells in vitro. **Journal of Functional Foods**, v. 22, p. 257–269, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.029>>.

MACHADO, Julio C. et al. Varietal discrimination of hop pellets by near and mid infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 180, n. September 2017, p. 69–75, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.12.030>>.

MAGALHÃES, Paulo J. et al. Analysis of xanthohumol and isoxanthohumol in different hop products by liquid chromatography-diode array detection-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, n. 1–2, p. 295–301, maio 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967306015640>>.

MAIETTI, Annalisa et al. Metabolite profiling of flavonols and in vitro antioxidant activity of young shoots of wild *Humulus lupulus* L. (hop). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 142, p. 28–34, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2017.04.043>>.

MAUL, Aldo Adolar; WASICKY, Roberto; BACCHI, Elfriede Marianne. Extração por fluido supercrítico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, 1996. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X1996000200006&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

MCCHESNEY, James D; RODENBURG, Douglas L. Preparative chromatography and natural products discovery. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 25, p. 111–113, fev. 2014.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166913007027>>.

MESOMO, Michele C. et al. Ginger (*Zingiber officinale* R.) extracts obtained using supercritical CO₂ and compressed propane: Kinetics and antioxidant activity evaluation. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 71, p. 102–109, nov. 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2012.08.001>>.

MILLIGAN, S. et al. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p. 235–242, 2002.

MOREIRA, Priscila Lucelia et al. Association between oxidative stress and nutritional status in the elderly. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 60, n. 1, p. 75–83, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-

42302014000100075&lng=en&tlng=en>.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. Varela ed. São Paulo: [s.n.], 1998.

NAJAFIAN, Sharareh. Storage conditions affect the essential oil composition of cultivated Balm Mint Herb (Lamiaceae) in Iran. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 575–581, 1 jan. 2014. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669013006365>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

NASCIMENTO, Andrea Dacal Peçanha do et al. Extraction of *Acrocomia intumescens* Drude oil with supercritical carbon dioxide: Process modeling and comparison with organic solvent extractions. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 111, p. 1–7, 1 maio 2016. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844616300134>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

NATOLINO, Andrea et al. Supercritical antisolvent precipitation of polyphenols from grape marc extract. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 118, p. 54–63, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2016.07.015>>.

NEVE, R. A. **Hops**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1991. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/978-94-011-3106-3>>.

NICKERSON, Gail B.; WILLIAMS, Peggy A.; HAUNOLD, Alfred. Varietal Differences in the Proportions of Cohumulone, Adhumulone, and Humulone in Hops. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 44, n. 2, p. 91–94, 1986.

OLADOKUN, Olayide et al. Perceived bitterness character of beer in relation to hop variety and the impact of hop aroma. **Food Chemistry**, v. 230, p. 215–224, 1 set. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814617303965>>. Acesso em: 11 fev. 2019.

ORGANIZATION, Food and Agriculture. **Food and Agriculture Organization - FAO**.

OVERK, Cassia R. et al. In vivo estrogenic comparisons of *Trifolium pratense* (red clover) *Humulus lupulus* (hops), and the pure compounds isoxanthohumol and 8-prenylnaringenin. **Chemico-Biological Interactions**, v. 176, n. 1, p. 30–39, out. 2008. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279708003190>>.

PALMER, John. **How to Brew: Everything you need to know to brew beer right the**. 1. ed.

[S.l.]: NATL Book Network, 2006.

PAVLIĆ, Branimir et al. Isolation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil by green extractions versus traditional techniques. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 23–28, 1 abr. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844615000613>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

PEREIRA, Camila G.; MEIRELES, M. Angela A. Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340–372, 3 jun. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11947-009-0263-2>>.

PEZESHK, Samaneh; REZAEI, Masoud; HOSSEINI, Hedayat. Effects of Turmeric, Shallot Extracts, and Their Combination on Quality Characteristics of Vacuum-Packaged Rainbow Trout Stored at 4 ± 1 °C. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 6, p. M387–M391, ago. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2011.02242.x>>.

PISOSCHI, Aurelia Magdalena; POP, Aneta. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 5 jun. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523415300039>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

POLAK, Justyna; BARTOSZEK, Mariola; STANIMIROVA, Ivana. A study of the antioxidant properties of beers using electron paramagnetic resonance. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 3042–3049, 1 dez. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613007395>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

POŁEĆ, Karolina et al. The influence of the essential oil extracted from hops on monolayers and bilayers imitating plant pathogen bacteria membranes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, n. October 2018, p. 672–680, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.047>>.

PROESTOS, C.; KOMAITIS, M. **Antioxidant capacity of hops**. [S.l.]: Elsevier Inc., 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00045-6>>.

PRONYK, C.; MAZZA, G. Design and scale-up of pressurized fluid extractors for food and

bioproducts. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 2, p. 215–226, 1 nov. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877409002775>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

PYO, Dongjin; KIM, Eojin. Rapid and efficient extraction of curcumins from curry powder using supercritical CO₂. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 35, n. 10, p. 3107–3110, 2014.

REVERCHON, Ernesto. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, n. 1, p. 1–37, 14 abr. 1997. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844697000144>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

REVERCHON, Ernesto; DE MARCO, Iolanda. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, n. 2, p. 146–166, 1 set. 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844606001008>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

RÓJ, Edward et al. Supercritical carbon dioxide hops extracts with antimicrobial properties. p. 1157–1171, 2015.

RYDBERG, Jan et al. (Org.). **Solvent Extraction Principles and Practice, Revised and Expanded**. [S.l.]: CRC Press, 2004. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/books/9780203021460>>.

RYDBERG, M Cox; MUSIKAS, C; CHOPPIN, GR. Principles and practices of solvent extraction. Second Edition, Revised and Expanded. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 80, n. 3, p. 359–360, mar. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1219>>.

SAHENA, F. et al. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 95, n. 2, p. 240–253, 1 nov. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877409003288>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

SANTOS, Kátia Andressa; DA SILVA, Edson Antônio; DA SILVA, Camila. Supercritical CO₂ extraction of favela (*Cnidocolus quercifolius*) seed oil: Yield, composition, antioxidant activity, and mathematical modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 165, p. 104981, nov. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844620302321>>.

SANZ, Vanesa et al. What is new on the hop extraction? **Trends in Food Science and Technology**, v. 93, n. August, p. 12–22, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.018>>.

SCHMIDT, Barbara et al. A natural history of botanical therapeutics. **Metabolism**, v. 57, p. S3–S9, 1 jul. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026049508000929>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

SCHÖNBERGER, C.; KOSTELECKY, T. The Role of Hops in Brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 3, p. 259–267, 2011.

SEGAWA, Shuichi et al. Clinical Effects of a Hop Water Extract on Japanese Cedar Pollinosis during the Pollen Season: A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 71, n. 8, p. 1955–1962, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1271/bbb.70157>>.

SHAHIDI, Fereidoon; AMBIGAIPALAN, Priyatharini. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 1 out. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615003023#f0020>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

SHARIF, K.M. et al. Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105–116, 1 mar. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877413005128>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

SHINADA, K. et al. Hop Bract Polyphenols Reduced Three-day Dental Plaque Regrowth. **Journal of Dental Research**, v. 86, n. 9, p. 848–851, 20 set. 2007. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/154405910708600908>>.

SILVA, Danielle C.M.N. et al. Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: Process parameters and composition profiles. **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, n. 4, p. 317–326, 1 dez. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308509000029>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

SILVA, Pedro Farkas. **Nutriagro**. Disponível em:

<<https://nutriagro.weebly.com/luacutepulo.html>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

SIMÕES, Cláudia Maria oliveira et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. ed. Florianópolis: UFSC, 2007.

SINGLETON, Vernon L.; ORTHOFER, Rudolf; LAMUELA-RAVENTÓS, Rosa M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods Enzymol.** [S.l.]: Academic Press, 1999. v. 299. p. 152–178. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687999990171>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

SOLANA, M. et al. Extraction of bioactive enriched fractions from *Eruca sativa* leaves by supercritical CO₂ technology using different co-solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 94, p. 245–251, 1 out. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896844614002654>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

STEVENS, Jan F. et al. Prenylflavonoid variation in *Humulus lupulus*: Distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. **Phytochemistry**, v. 53, n. 7, p. 759–775, 2000.

STEVENS, Jan F.; PAGE, Jonathan E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: To your good health! **Phytochemistry**, v. 65, n. 10, p. 1317–1330, 2004.

STEWART, Graham G. A History of Beer and Brewing: by Ian S. Hornsey. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 110, n. 3, p. 233–234, 2004. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00209.x>>.

SULAIMAN, Ghassan M. et al. Chemical characterization of Iraqi propolis samples and assessing their antioxidant potentials. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2415–2421, 1 set. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691511003048>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

SURVESWARAN, Siddharthan et al. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, v. 102, n. 3, p. 938–953, 1 jan. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030881460600522X>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

TEDONE, Laura et al. Hop (*Humulus lupulus* L.) Volatiles Variation During Storage. **Journal of**

the American Society of Brewing Chemists, v. 78, n. 2, p. 114–125, 2020. Disponível em:
<<https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1704674>>.

TEIXEIRA, Gerson Lopes et al. Assessment of subcritical propane, supercritical CO₂ and Soxhlet extraction of oil from sapucaia (*Lecythis pisonis*) nuts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 133, n. October 2017, p. 122–132, mar. 2018. Disponível em:
<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844617306150>>.

TOFANA, Maria et al. The validation of the HPLC Hop Bitter acids method. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 15, n. 1, p. 50–54, 2009. Disponível em:
<www.japt.tpa.usab-tm.ro>.

TREVISANI JUCHEN, Patricia et al. Extraction of parboiled rice bran oil with supercritical CO₂ and ethanol as co-solvent: Kinetics and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 139, p. 111506, nov. 2019.

VAN OPSTAELE, Filip et al. Production of novel varietal hop aromas by supercritical fluid extraction of hop pellets. Part 1: Preparation of single variety total hop essential oils and polar hop essences. **Cerevisia**, v. 37, n. 4, p. 97–108, 2013. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.cervis.2012.12.002>>.

VEIGA, Bruno Aguilar et al. Compressed fluids extraction methods, yields, antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content for Brazilian Mantiqueira hops. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 170, 2021a.

VIEGAS, Olga et al. Protective effects of xanthohumol against the genotoxicity of heterocyclic aromatic amines MeIQx and PhIP in bacteria and in human hepatoma (HepG2) cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 3–4, p. 949–955, 1 mar. 2012. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691511006223>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

VIGANÓ, Juliane et al. Exploring the selectivity of supercritical CO₂ to obtain nonpolar fractions of passion fruit bagasse extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 110, p. 1–10, 1 abr. 2016. Disponível em:
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089684461530200X>>. Acesso em: 17 fev. 2019.

WANASUNDARA, Udaya; AMAROWICZ, Ryszard; SHAHIDI, Fereidoon. Isolation and Identification of an Antioxidative Component in Canola Meal. **Journal of Agricultural and**

Food Chemistry, v. 42, n. 6, p. 1285–1290, 1994.

WANG, Lijun; WELLER, Curtis L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants.

Trends in Food Science & Technology, v. 17, n. 6, p. 300–312, 1 jun. 2006. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224405003559>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

WENCESLAU, Bruno Rodrigues et al. Guariroba (*Syagrus oleracea*) kernel oil extraction using supercritical CO₂ and compressed propane and its characterization. **The Journal of**

Supercritical Fluids, v. 177, p. 105326, nov. 2021. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896844621001662>>.

WOJDYŁO, Aneta; OSZMIAŃSKI, Jan; CZEMERYS, Renata. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, n. 3, p. 940–949, 1 jan. 2007.

Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814607003974>>.

Acesso em: 17 fev. 2019.

YAHIRO, Kinnoosuke et al. Inhibitory Effects of Polyphenols on Gastric Injury by *Helicobacter pylori* VacA Toxin. **Helicobacter**, v. 10, n. 3, p. 231–239, jun. 2005. Disponível em:

<<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1523-5378.2005.00315.x>>.

YASUKAWA, K. et al. Inhibitory effect of edible plant extracts on 12-O-tetradecanoylphorbol–13-acetate-induced ear oedema in mice. **Phytotherapy Research**, v. 7, n. 2, p. 185–189, mar. 1993.

ZHISHEN, Jia; MENGCHENG, Tang; JIANMING, Wu. **The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry**. [S.l.: s.n.], 1999