



Extração de compostos fenólicos a partir de resíduo de lúpulo (*Humulus lupulus* L.) Proveniente de *Dry Hopping* utilizando extração com líquidos pressurizados assistida por ultrassom

Palavras-Chave: ANTIOXIDANTE, COMPOSTOS BIOATIVOS, UAPLE

Autores(as):

GABRIELA CORDEIRO SILVA, FEA – UNICAMP

AMANDA MELLISSA BEZERRA OLIVEIRA, FEA - UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). JULIAN MARTÍNEZ (orientador(a)), FEA - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, atrás somente da China e dos Estados Unidos. O setor é um dos mais relevantes da economia brasileira. Com produção anual de 14,1 bilhões de litros por ano e faturamento de 107 bilhões de dólares, o mercado cervejeiro representa 1,6% do Produto Interno Bruto (PIB) e é responsável pela geração de 2,7 milhões de empregos ao longo da cadeia produtiva, sendo considerado um dos maiores empregadores do Brasil (CERVBRASIL, 2022). O *Dry Hopping* é um processo de extração fria e aquosa onde o lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é adicionado à cerveja durante a etapa de fermentação enquanto a cerveja está sendo resfriada. Essa técnica tem o objetivo de fornecer propriedades do lúpulo para a cerveja, a fim de alcançar o aroma e o sabor intensos do lúpulo na cerveja. Os resíduos de lúpulo são subutilizados, sendo empregados apenas na alimentação de ruminantes e como adubo para o solo (HAUSER; LAFONTAINE; SHELLHAMMER, 2019; PIOVESAN; SOARES; COSTA, 2020).

O lúpulo é uma planta amplamente utilizada na produção de cerveja devido às suas propriedades aromáticas e de amargor, mas também possui um complexo perfil químico que confere diversos benefícios à saúde. Dentre os principais compostos bioativos presentes no lúpulo, destacam-se os ácidos alfa e beta, os prenilflavonoides e os polifenóis, que apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anticancerígenas (DURELLO; SILVA; BOGUSZ JR, 2019; LIN et al., 2019). Os polifenóis são metabólitos secundários que compreendem até 4% do peso total dos cones de lúpulo seco, já os ácidos alfa e beta são componentes bioativos cruciais presentes no lúpulo. Além de conferirem o amargor característico à cerveja, esses ácidos possuem uma série de propriedades benéficas para a saúde humana. Os ácidos alfas exibem atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias, desempenhando um papel na preservação da qualidade e segurança dos alimentos, bem como na

prevenção de doenças. Além disso, estudos indicam que esses ácidos possuem atividade anticancerígena, inibindo o crescimento de células tumorais. Já os beta-ácidos também contribuem para a saúde cardiovascular, reduzindo o risco de doenças cardíacas. Em resumo, os ácidos alfa e beta são compostos bioativos de grande importância no lúpulo, com potencial para aplicações terapêuticas e funcionais em diversas áreas (ALMAGUER et al., 2014). O consumo regular destes compostos pode ajudar a combater várias doenças, através de diversos mecanismos, mas, principalmente, pela sua forte capacidade antioxidante e pelas propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias (ARNOSO; COSTA; SCHMIDT, 2019).

A Extração líquida pressurizada assistida por ultrassom (UAPLE) é uma técnica inovadora, que utiliza a energia ultrassônica durante a extração com líquidos pressurizados. Essa abordagem intensifica a recuperação de compostos fenólicos, resultando em maior quantidade e qualidade dos compostos extraídos. A busca por métodos eficientes e sustentáveis na extração de compostos bioativos é uma área em crescimento, e a UAPLE apresenta potencial para impulsionar a descoberta de novos compostos bioativos e o desenvolvimento de aplicações terapêuticas, cosméticas e alimentícias.

METODOLOGIA:

A matéria-prima do trabalho foi o resíduo de lúpulo resultante de *Dry Hopping*, durante a produção de cerveja. O resíduo foi doado pela Cervejaria Dogma, São Paulo, SP, Brasil. As amostras foram armazenadas em pacotes herméticos e mantidas em freezer a -18 °C até o momento das extrações.

UAPLE (*Ultrasound-assisted pressurized liquid extraction*)

Para cada extração, 5 g de resíduo de lúpulo foram adicionados a uma célula de extração de aço inoxidável com capacidade de 300 mL. Como solvente, foram utilizadas misturas de etanol e água (50, 75 e 100%, 3:1, m/m). As extrações foram realizadas a 10 MPa e três temperaturas (70, 90 e 110 °C). A frequência ultrassônica foi fixada em 20 kHz, e a potência variou entre 20% e 60% da potência máxima do equipamento (160, 240 e 480 W, respectivamente) e tempo de 20 minutos. Após a extração, a mistura de solvente e extrato foi descomprimida em uma válvula micrométrica. O volume recuperado foi medido, e o extrato resultante foi armazenado em frascos escuros, devidamente vedados e protegidos da luz, a -18 °C.

Caracterização dos extratos

Até o momento, foram caracterizados somente os extratos de 75 e 100%. Esses extratos foram caracterizados em termos de fenólicos totais e capacidade antioxidante por FRAP. As demais análises estão em andamento e os resultados completos serão divulgados no relatório final e na apresentação do seminário de iniciação científica.

Fenólicos totais (FT)

O teor de fenólicos totais foi determinado utilizando-se a metodologia de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton et al. (1999), com algumas modificações. Inicialmente, foram preparadas diluições de ácido

gálico em concentrações de 0,02 a 0,2 mg/mL, para servirem como padrão de calibração. As diluições foram feitas em água destilada até que a absorbância estivesse na faixa de 0,1 a 0,9. Em seguida, foram pipetados o branco, o padrão de calibração e as amostras em uma microplaca transparente de 96 poços. Foram adicionados 20 µL de Folin-Ciocalteu e, após 3 minutos de reação, acrescentou-se 20 µL de solução saturada de carbonato de sódio. Para finalizar o processo, foram pipetados em cada poço 140 µL de água destilada. Toda a reação ocorreu em temperatura ambiente, protegida da luz, durante 120 minutos. A absorbância foi medida a 725 nm utilizando um leitor de microplacas (FLUOstar Omega BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Alemanha). O teor fenólico total foi calculado como equivalente de ácido gálico e todas as amostras foram analisadas em triplicata.

FRAP (*Ferric reducing antioxidant power*)

A capacidade redutora férrica dos extratos foi avaliada utilizando o método FRAP, conforme descrito por Benzie e Strain (1996), com algumas modificações. Cada extrato foi diluído em água destilada até que a absorbância estivesse entre 0,1 e 0,9. A solução FRAP foi preparada utilizando tampão acetato 0,3 M (pH 3,6), TPTZ 10 mM em HCl 40 mM e solução FeCl₃ 20 mM. Posteriormente, a absorbância foi medida a 595 nm em um leitor de microplacas (FLUOstar Omega BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Alemanha). Uma curva padrão de Trolox foi construída, utilizando concentrações que variaram de 0,01 a 0,06 mg/mL. Os resultados foram expressos em mg de Trolox equivalente (TE) por grama de matéria-prima em base seca.

Análise estatística

A análise estatística foi conduzida utilizando análise de variância (ANOVA) com um nível de significância de 5% pelo teste de Tukey. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, e os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Caracterização dos extratos

Conteúdo de fenólicos totais (FT)

Em relação ao solvente 75% etanol, a análise de fenólicos totais mostrou um aumento no rendimento fenólico de 4,66 para 6,35 mg GAE/g MP com o aumento da potência de 240 para 480 W. Esse aumento pode estar associado ao maior rompimento das paredes celulares das amostras vegetais e à maior solubilização dos compostos fenólicos no solvente sob a ação de maior energia ultrassônica. No entanto, ao diminuir a potência para 160 W, observou-se uma queda do conteúdo fenólico em todas as temperaturas testadas. Isso indica que o emprego de maior energia ultrassônica foi benéfico para a extração dos compostos fenólicos, independente da temperatura.

Quanto ao solvente etanol 100%, a 160 W, verificou-se um maior rendimento fenólico em relação ao 75%, o que indica uma resposta positiva da extração quando comparado com o solvente a 75% na mesma potência. Contudo, ao aumentar a potência para 240 W, foi observada uma queda no conteúdo fenólico extraído à medida que a temperatura aumentava para 90 °C. Esse comportamento pode estar

relacionado à volatilização dos compostos fenólicos em temperaturas mais elevadas ou à formação de subprodutos indesejados. Curiosamente, em 240 W na temperatura de 110 °C, houve um aumento de extração de compostos fenólicos, sugerindo que a combinação de maior potência ultrassônica com o solvente mais puro pode ter facilitado a liberação dos compostos fenólicos das matrizes vegetais, resultando em uma extração em maior quantidade.

FRAP

Em relação à capacidade antioxidante pelo FRAP, os resultados variaram entre 3,57 e 5,39 mg TE/g MP. Foi possível observar que, para o solvente de 100% etanol e potência de 160 W, o aumento da temperatura se mostrou essencial no aumento da capacidade antioxidante dos extratos. A análise dos dados mostrou que as alterações mais significativas na capacidade antioxidante ocorreram a 110 °C, enquanto nas temperaturas de 70 °C e 90 °C, os resultados foram menores. A 240 W, os extratos obtidos nas temperaturas de 70 °C e 110 °C apresentaram uma capacidade antioxidante maior em comparação com a temperatura de 90 °C. O aumento da atividade antioxidante pode estar relacionado à maior eficiência da extração dos compostos bioativos com o aumento da temperatura. Entretanto, as análises futuras deverão ajudar a elucidar o desvio ocorrido a 90 °C. Ao investigar condições ainda mais intensas (480 W), para o solvente de 100%, observou-se um aumento gradativo da capacidade antioxidante em cada uma das temperaturas testadas. Os resultados mostraram que a temperatura de 110 °C foi relevante na obtenção de extratos com alta capacidade antioxidante, mesmo sob essas condições de extração mais vigorosas. Esses resultados sugerem que a UAPLE foi influenciada tanto pela potência do ultrassom, quanto pela temperatura e composição do solvente. A potência do ultrassom é crucial para promover uma maior liberação dos compostos antioxidantes presentes no material vegetal. Além disso, a temperatura desempenha um papel importante, com 110 °C sendo a temperatura ótima para a extração de compostos antioxidantes no solvente 100% etanol.

Os resultados obtidos na análise FRAP para o solvente 75% etanol e diferentes potências (160, 240 e 480 W) mostraram comportamentos distintos em relação à temperatura. Observou-se que, em todas as temperaturas testadas (70, 90 e 110 °C), houve um acréscimo sutil da capacidade antioxidante, indicando que esse solvente pode não ser a melhor escolha para a extração dessa matéria vegetal. Entretanto, um padrão diferente foi observado quando se analisou o solvente de 75% com a potência de 480 W. Nesse caso, houve um aumento gradativo na atividade antioxidante a cada temperatura utilizada, sendo que os maiores resultados foram obtidos em 110 °C. Isso sugere que a potência de 480 W pode estar desempenhando um papel importante na extração de compostos antioxidantes, e que a temperatura de 110 °C é favorável para liberar esses compostos nessas condições.

CONCLUSÕES:

Em suma, os resultados da UAPLE empregando solventes a 75 e 100% etanol demonstraram que as variações nas condições experimentais, como potência e temperatura, influenciaram a quantidade de compostos fenólicos extraídos e na capacidade antioxidante dos extratos. A potência de

160 W mostrou-se mais eficiente para a extração em 100% etanol e a potência de 480 W para a de 75%. As potências mais altas podem ter afetado negativamente o rendimento da extração em um solvente mais puro, possivelmente por alterações físico-químicas nos extratos. Em relação à capacidade antioxidante dos extratos, a temperatura de 110 °C foi o parâmetro de maior importância, uma vez que influenciou de forma positiva o aumento da capacidade antioxidante dos extratos recuperados.

Como mencionado na seção de metodologia, algumas análises ainda estão em andamento e seus resultados ajudarão a elucidar os fenômenos abordados neste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

ALMAGUER, C.; SCHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. **J. Inst. Brew**, 120: 289–314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>. 2014.

ARNOSO, B. J. DE M.; DA COSTA, G. F.; SCHMIDT, B. Biodisponibilidade e classificação de compostos fenólicos. *Nutrição Brasil*, 18(1), 39-48. <https://doi.org/10.33233/nb.v18i1.1432>. 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CERVEJA – CERVBRA. 2022. Dados do setor cervejeiro nacional. Disponível em: www.cervbrasil.org.br/novo_site/. Acesso em: 12 jul. 23.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76. 1996.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. Hop Chemistry. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 900–919. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>. 2019.

FERREIRA, B., BEIK, J., ALVES, S., HENRIQUE, F., SAUER, E., CHORNOBAID, C., BOWLES, S., & CHAVES, E. (2020). Extração assistida por ultrassom para determinação de lipídeos em alimentos: um experimento de laboratório. *Química Nova*. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170592>. 2020.

HAUSER, R.; LAFONTAINE, S. R.; SHELLHAMMER, T. H. Extração Eficiência de Dry-Hopping, **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, 77:3, 188-198. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1617622>. 2019.

OU, B.; CHANG, T.; HUANG, D.; PRIOR, R. L. Determination of Total Antioxidant Capacity by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using Fluorescein as the Fluorescence Probe: First Action 2012.23. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 96, 1372–1376. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.13-175>. 2013.

PAGANO, I.; CAMPONE, L.; CELANO, R.; PICCINELLI, A. L.; RASTRELLI, L. Green non-conventional techniques for the extraction of polyphenols from agricultural food by-products: A review. *Journal of Chromatography A*, 1651, 462295. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462295>. 2021.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In L. Packer (Ed.), *Oxidants and Antioxidants, Part A* 299, 152–178, 1999.

TRIPODO, G., IBÁÑEZ, E., CIFUENTES, A., GILBERT-LÓPEZ, B., & FANALI, C. Optimization of pressurized liquid extraction by response surface methodology of Goji berry (*Lycium barbarum* L.) phenolic bioactive compounds. *ELECTROPHORESIS*, 39(13), 1673–1682. <https://doi.org/10.1002/elps.201700448>. 2018.

ZABOT, G. L., VIGANÓ, J., & SILVA, E. K. (2021). Low-Frequency Ultrasound Coupled with High-Pressure Technologies: Impact of Hybridized Techniques on the Recovery of Phytochemical Compounds. *Molecules*, 26(17), 5117. <https://doi.org/10.3390/molecules26175117>