

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DIRETORIA DE PÓS GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL  
COORDENAÇÃO DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOTECNOLÓGICOS**

**ANDREY LOPES**

**OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Humulus lupulus* DE DIFERENTES CULTIVARES BRASILEIRAS**

**TOLEDO  
2021**

**ANDREY LOPES**

**OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÓLEO  
ESSENCIAL DE *Humulus lupulus* DE DIFERENTES CULTIVARES BRASILEIRAS**

**OPTIMIZATION OF THE ESSENTIAL OIL QUANTIFICATION METHODOLOGY  
FOR *Humulus lupulus* FROM DIFFERENT BRAZILIAN VARIETIES**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGQB – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Câmpus Toledo, como requisito para obtenção do título de “Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos” – Área de Concentração: Engenharia Biotecnológica.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane da Silva Lobo

**TOLEDO**

**2021**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



ANDREY LOPES

**OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL DE HUMULUS LUPULUS DE DIFERENTES CULTIVARES BRASILEIRAS.**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 20 de Dezembro de 2021

Prof.a Viviane Da Silva Lobo, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Araceli Scalcon, Doutorado - Universidade Estadual de Maringá (Uem)

Prof Renato Eising, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 20/12/2021.

Dedico este trabalho:

Em especial à minha mãe Andréa, pelo exemplo de pessoa, pela mulher forte e batalhadora, por sempre fazer o possível e o impossível para que eu pudesse chegar onde estou, por acreditar em mim quando ninguém mais acreditou, nem mesmo eu. Ao meu irmão Felype, que, nas horas mais sombrias da minha vida, esteve ao meu lado me dando luz. E por fim, mas não menos importante, ao meu pai Neivaldo, que seja lá onde estiver, está olhando por mim, e estará sempre iluminando meu caminho e tocando meu coração. A estas pessoas dedico não somente este trabalho, mas os próximos, dedico toda a minha vida a eles.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida pela vida e por estarem iluminando os meus passos, que ao lado de meu pai Neivaldo sempre me dão força para não desistir a cada obstáculo encontrado.

À minha orientadora e mentora Viviane da Silva Lobo, pela confiança, pelos ensinamentos e compreensão que depositou em mim. Por acreditar em mim quando mais precisei, por todas as palavras de motivação, por todo o apoio pessoal e profissional, por ser uma verdadeira mãe nos momentos que mais foram necessários.

A todos os queridos professores da UTFPR, pelos conhecimentos ensinados em aula e até mesmo fora dela. Por amarem o que fazem, e transpassarem sua felicidade com a profissão durante as aulas.

Aos colegas e amigos do Biopark Leticia, Kennidy, Henrique e a Dra Maíke Montanhini pela breve companhia no mundo dos queijos finos. Aos meus amigos do mestrado pela convivência e companheirismo, em especial ao Douglas, Sergio, Jeferson, Emerson e Anderson por estarem ao meu lado nesta trajetória e por me auxiliarem nos conhecimentos que aprendemos juntos.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa GPTEQ Adson, Adriel e Alexandre que sempre me auxiliaram nas jornadas de pesquisa. Assim como meu amigo Ruffer.

Aos técnicos dos Laboratórios de Processos Químicos do campus de Toledo, em especial Rafael, assim como ao Laboratório Multiusuário da Central Analítica da UTFPR- Campus Toledo.

À Lúpulos Dalcin pelo fornecimento das amostras.

Ao Programa de Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos e a UTFPR – Campus Toledo pela estrutura física e profissional disponibilizada aos alunos.

Ao CNPq e a Fundação Araucária pelo suporte financeiro para a pesquisa.

À Embrapa pelo suporte técnico para extrações e análise de CG.

“Às vezes é preciso aprender a correr antes de  
começar a andar.”

Tony Stark

## RESUMO

O lúpulo é, muitas vezes, considerado a principal essência da cerveja, mas poucos o conhecem, tão pouco sabem seu potencial. O processo complexo de fabricação da cerveja já é algo extremamente impactante em sua qualidade, entretanto o lúpulo pode ser considerado a sua principal matéria prima, responsável direto pelo sabor e os demais aspectos organolépticos desta bebida fermentada. O aumento tanto da produção agrícola do lúpulo quanto da produção de cervejas artesanais, que necessitam de lúpulos com maiores qualidades, acarretam em uma necessária tendência de elaborações e melhorias de técnicas envolvidas com o processamento. Vislumbrando esta tendência, o presente trabalho se propôs a buscar a otimização da metodologia utilizada para extração e quantificação de óleo essencial no lúpulo para diminuir os custos com as análises desse material. A quantidade deste está diretamente ligada a definir a sua qualidade, assim como a sua forma de processamento na cerveja. Para isto utilizou-se 2 equipamentos diferentes para hidrodestilação do lúpulo: o Clevenger e o Farmacopeico. Utilizando diferentes massas de plantas e diferentes tempos de extração com diferentes cultivares de lúpulo foi possível obter os óleos essenciais do lúpulo brasileiro, produzidos no estado de São Paulo, aos quais denotaram uma variação média dos índices de refração de 1,4690 a 1,4823 e 74,17 a 76,67 de  $n_D$ , respectivamente. Para a densidade relativa, foram obtidos valores variando de 0,789 a 0,836. Através da análise de CG/MS da cultivar Cascade foi possível visualizar a composição química de seu óleo essencial extraído em diferentes tempos. Em sua composição foi possível visualizar altos teores de mircenos e farneseno. Após os experimentos foi possível identificar que as diferentes cultivares e maiores quantidades de massa vegetal são os principais fatores de impacto nas metodologias de extrações, tanto para o equipamento Clevenger quanto para o Farmacopeico.

Palavras-chave: lúpulo; metabólitos secundários; hidrodestilação; propriedades físico-químicas.

## ABSTRACT

Hops are often considered the main essence of beer, but few know it, nor know its potential. The complex process of brewing beer is something extremely impacting in its quality, however, the hops can be considered a main raw material, directly responsible for the flavor and the other organoleptic aspects of this fermented drink. The increase in both the agricultural production of hops and the production of craft beer, which originates from hops with greater qualities, leads to a tendency to elaborate and improve the techniques involved in processing. In a glimpse of this trend, the present work proposed to seek an optimization of the application for extraction and quantification of essential oil in the hops, chasing the goal of optimization the methodology used for extraction e quantification of hops' essential oil to reduce costs with the analysis of this material. The amount of this essential oils is directly linked to defining its quality, as well as the way it is processed in beer. For this, 2 different equipments were used for the hidrodestilation of hops, the Clevenger and the Pharmacopeic. Using different masses of plants, different extraction times with different hop cultivars, it was possible to obtain essential oils of Brazilian hops, produced in the state of São Paulo, which denoted an average variation of refractive indices from 1.4690 to 1.4823 and 74.17 to 76.67 of  $n_D$ , respectively. For the relative density, values ranging from 0.789 to 0.836 were captured. Analyzing the CG/MS of the cultivars it was possible no notice the chemical composition of the extracted essential oil in different times. Was possible to visualize in this composition, high contents of Myrcene and Farnesene. After the experiments it was possible to identify that as different varieties and larger amounts of vegetal mass are the main impact factors in the methodologies of extractions, both for the Clevenger equipment and the Pharmacopeic.

Keywords: hop; secondary metabolites; hidrodestilation; physicochemical properties.



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> - Composição química – cultivar Centennial.....	21
<b>Tabela 02</b> - Composição química – cultivar Comet .....	21
<b>Tabela 03</b> - Composição química – cultivar Columbus.....	22
<b>Tabela 04</b> - Composição química – cultivar H-Mitt .....	23
<b>Tabela 05</b> - Comparação da composição química – cultivar H-Mitt.....	23
<b>Tabela 06</b> - Composição química – cultivar Chinook.....	23
<b>Tabela 07</b> - Composição química – cultivar Cascade.....	24
<b>Tabela 08</b> - Planejamento das extrações de OE para testes prévios .....	34
<b>Tabela 09</b> - Níveis codificados e suas variáveis reais - Clevenger.....	34
<b>Tabela 10:</b> Níveis codificados e suas variáveis reais - Farmacopeico .....	35
<b>Tabela 11</b> - Comparação da quantificação por Clevenger e Farmacopeico.....	39
<b>Tabela 12</b> - Composição química do OE de Cascade da amostra Clevenger 01...42	
<b>Tabela 13</b> - Comparativo das composições químicas das amostras de Cascade..	43
<b>Tabela 14</b> - Umidade das amostras de Lúpulo em três metodologias.....	46
<b>Tabela 15</b> - Rendimento de OE de Lúpulo em Base Seca – Clevenger.....	47
<b>Tabela 16</b> - Rendimento de OE de Lúpulo em Base Seca – Farmacopeico..	52
<b>Tabela 17</b> - Índice de Refração – OE de diferentes cultivares de Lúpulo.....	57
<b>Tabela 18</b> - Densidade Relativa ( $D_{20}^{20}$ ) – OE de diferentes cultivares de Lúpulo...58	

## LISTA DE IMAGENS

<b>Imagem 01</b> - Plantas em floração, a esquerda masculina, direita feminina. ....	17
<b>Imagem 02</b> - Glândulas de lupulina na superfície exterior das bractéolas .....	18
<b>Imagem 03</b> - Aglomerados de lupulina em microscópio.....	18
<b>Imagem 04</b> - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 2X - COLUMBUS	67
<b>Imagem 05</b> - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 1X COLUMBUS ..	68
<b>Imagem 06</b> - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 2X CENTENIAL...	69
<b>Imagem 07</b> - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 1X CENTENIAL...	70
<b>Imagem 08</b> - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 2X CHINOOK .....	71
<b>Imagem 09</b> - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 1X CHINOOK .....	72
<b>Imagem 10</b> - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 2X COMET .....	73
<b>Imagem 11</b> - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 1X COMET .....	74
<b>Imagem 12</b> - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 2X H-MITT .....	75
<b>Imagem 13</b> - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 1X H-MITT .....	76

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> - Tipos de formatos das diferentes variedades de lúpulo.....	20
<b>Figura 02</b> - Diferentes formatos dos cones de lúpulo.....	20
<b>Figura 03</b> - Principais substâncias encontradas no óleo essencial de lúpulo.....	26
<b>Figura 04</b> - Esquema da extração molecular dos óleos essenciais.....	28
<b>Figura 05</b> - Aparelho de extração de OE tipo Clevenger.....	28
<b>Figura 06</b> - Esquema de extração por arraste á vapor.....	29
<b>Figura 07</b> - Aparelho para destilação azeotrópica.....	31
<b>Figura 08</b> - Vidraria - sistema Farmacopeico (Equipamento 01).....	32
<b>Figura 09</b> - Vidraria - sistema Clevenger (Equipamento 02).....	33
<b>Figura 10</b> - Análise estatística ANOVA – equipamento Clevenger.....	49
<b>Figura 11</b> - Gráfico de Pareto dos Efeitos – equipamento Clevenger.....	50
<b>Figura 12</b> - Gráfico de Efeitos Principais – equipamento Clevenger.....	50
<b>Figura 13</b> - Gráfico de Interações – equipamento Clevenger.....	51
<b>Figura 14</b> - Análise estatística ANOVA – equipamento Farmacopeico. ....	53
<b>Figura 15</b> - Gráfico de Pareto dos Efeitos – equipamento Farmacopeico .....	54
<b>Figura 16</b> - Gráfico de Efeitos Principais – equipamento Farmacopeico. ....	54
<b>Figura 17</b> - Gráfico de Interações – equipamento Farmacopeico. ....	55
<b>Figura 18</b> - Gráfico Bloxpot médias da concentração de diferentes cultivares. ...	56
<b>Figura 19</b> - Cromatograma CG/FID amostra Clevenger - 01. ....	77
<b>Figura 20</b> - Cromatograma CG/FID amostra Farmacopeico - 01.....	77
<b>Figura 21</b> - Cromatograma CG/FID amostra Clevenger - 02. ....	78
<b>Figura 22</b> - Cromatograma CG/FID amostra Farmacopeico - 02.....	78
<b>Figura 23</b> - Cromatograma CG/FID amostra Clevenger - 03. ....	79
<b>Figura 24</b> - Cromatograma CG/FID amostra Farmacopeico - 03.....	79
<b>Figura 25</b> - Cromatograma CG/FID amostra Clevenger - 04. ....	80
<b>Figura 26</b> - Cromatograma CG/FID amostra Farmacopeico - 04.....	80
<b>Figura 27</b> - Cromatograma CG/FID amostra Padrão. ....	81

## LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

$\mu\text{L}$	Microlitro;
ANOVA	Análise de variância;
BS	Base Seca;
c	Concentração;
C.V.	Coefficiente de Variação;
CG/FID	<i>Gas chromatography- flame ionization detector</i>
Exp.	Experimento
g	Gramas;
GC/MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry;</i>
LC/MS	<i>Liquid chromatography- mass spectrometry;</i>
m	Massa;
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento;
Min	Minuto;
mL	Mililitro;
$n_D$	Índice de refração
OE	Óleo Essencial;
PA	Para Análise;
$R^2$	Coefficiente de determinação;
Tr	Tempo de Retenção
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
v	Volume;

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>1.1 Objetivos</b> .....	<b>14</b>
1.1.1 Objetivo geral .....	14
1.1.2 Objetivos específicos.....	14
<b>1.2 Justificativa</b> .....	<b>14</b>
<b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 A produção e o Mercado do Lúpulo</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2 Taxonomia do Lúpulo</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3 Variedades do Lúpulo e suas composições</b> .....	<b>19</b>
2.3.1 Cultivares de lúpulos .....	20
2.3.1.1 <i>Cultivar Centenial</i> .....	20
2.3.1.2 <i>Cultivar Comet</i> .....	21
2.3.1.3 <i>Cultivar Columbus</i> .....	21
2.3.1.4 <i>Cultivar H-Mitt</i> .....	22
2.3.1.5 <i>Cultivar Chinook</i> .....	23
2.3.1.6 <i>Cultivar Cascade</i> .....	24
<b>2.4 Óleo essencial</b> .....	<b>24</b>
2.4.1 OE de lúpulo.....	25
2.4.2 Métodos de obtenção do óleo essencial .....	27
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 Microscopia óptica dos cones de lúpulo</b> .....	<b>30</b>
<b>3.2 Teor de Umidade da Planta</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3 Extração do OE de lúpulo</b> .....	<b>32</b>
<b>3.4 Planejamento Experimental</b> .....	<b>34</b>
<b>3.5 Caracterização do OE de lúpulo</b> .....	<b>35</b>
3.5.1 Determinação da Densidade Relativa ( $D_{20}^{20}$ ).....	35
3.5.2 Determinação do Índice de Refração .....	36
3.5.3 Quantificação e Identificação dos compostos do OE .....	36
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>4.1 Testes Preliminares</b> .....	<b>39</b>
4.1.1 Extração de OE de lúpulo.....	39
4.1.2 Quantificação e Identificação dos compostos do OE de lúpulo .....	40
<b>4.2 Otimização da Metodologia de Extração do OE de lúpulo</b> .....	<b>44</b>

4.2.1 Microscopia dos cones de lúpulo .....	44
4.2.2 Umidade das amostras de lúpulo .....	46
4.2.3 Otimização da Metodologia de Extração do OE de lúpulo .....	47
4.2.4 Índice de Refração do OE de lúpulo.....	57
4.2.5 Densidade Relativa do OE de lúpulo.....	58
<b>5 ETAPAS POSTERIORES E RESULTADOS ESPERADOS.....</b>	<b>60</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO C - Lei n. 9.610, de 19 de fevereiro de 1998 .....</b>	<b>82</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os Óleos Essenciais (OE), também conhecidos como “a alma da planta”, são definidos pela ISO 9235:2013 (ISO, 2013), como um produto obtido de uma matéria-prima de origem vegetal, por destilação com água ou vapor d’água, por destilação a seco ou ainda pelo uso de processos mecânicos (prensagem) do epicarpo de frutos cítricos. Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, concentrados ou desterpenados<sup>1</sup>.

Os óleos essenciais são misturas de compostos voláteis originados por um conjunto de substâncias químicas produzidas pelas plantas com a função, na maioria das vezes, de autodefesa ou de atração de animais polinizadores. Estes compostos voláteis podem ser produzidos pelas plantas nas seguintes partes: flores, cascas de frutos (denominados cítricos), folhas e pequenos grãos (*petitgrain*), raízes, cascas de árvores, resinas da casca e sementes (WOLFFENBUTTEL, 2007).

O *Humulus lupulus* é uma planta dicotiledônea que pertence à família *Cannabaceae* e possui seu principal uso na fabricação de cervejas (ALMAGUER, 2014; RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018). O *H. lupulus* pode ser descrito como uma trepadeira perene, que produz flores (também conhecidas por cones) ricas em resinas, polifenóis e óleos essenciais (BAMFORTH, 2003).

Majoritariamente, os óleos essenciais do lúpulo são constituídos de terpenóides que são formados principalmente por meio da via biossintética do acetato-mevalonato (BOCQUET et al, 2018). Lúpulos, que apresentam baixas quantidades de humulonas e lupulonas ( $\leq 5\%$ ) e que são capazes de conferir aromas característicos e intensos em função da composição química dos seus óleos essenciais, são denominados de lúpulos de aroma (PALMER, 2017).

---

<sup>1</sup> Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados; por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos.

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Otimizar a metodologia da quantificação do óleo essencial de cones de lúpulo, caracterizando os diferentes cultivares de origem brasileira.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Reduzir a quantidade de material vegetal utilizada na quantificação de óleo essencial de lúpulo;
- Reduzir o tempo demandado para extração de óleo essencial de lúpulo;
- Comparar as metodologias de extração de óleo essencial, usando vidraria Farmacopéica e Clevenger;
- Validar o uso do equipamento Farmacopeico para extração do óleo;
- Consolidar a técnica extrativa para diferentes cultivares de lúpulo, com redução de quantidade e tempo na obtenção;
- Caracterizar o óleo essencial de diferentes cultivares de lúpulos produzidos no Brasil.

## **1.2 Justificativa**

Várias pesquisas apontam um enorme crescimento tanto do consumo de lúpulo de alta qualidade, como a expansão do plantio desta planta, tanto no Brasil, como em todo o mundo, isto devido ao aumento do consumo e produção de cervejas artesanais. O desenvolvimento, assim como melhorias das técnicas de avaliação de qualidade e caracterização de produtos, que estão em estágio de expansão de consumo, são de fundamental importância tanto para a estabilizar esta expansão produtiva, quanto para consolidá-la ainda mais no território de estudo. O presente estudo possibilitará não somente uma melhoria de técnica laboratorial, mas também um vislumbre da qualidade e das características das diferentes cultivares de lúpulos colhidos no Brasil atualmente.



## 2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Este capítulo tem o objetivo de agrupar as informações que denotam a importância do lúpulo e seu respectivo estudo, perante ao mercado nacional e global. Neste capítulo será possível compreender os pilares teóricos que norteiam o presente estudo.

### 2.1 A produção e o Mercado do Lúpulo

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (BRASIL, 2019), lúpulo são considerados os cones da inflorescência da espécie vegetal *Humulus lupulus*, podendo ser em sua forma natural ou industrializada. Correspondentemente, seu extrato é considerado como sendo o produto obtido da extração, por solvente adequado, dos princípios aromáticos ou amargos do lúpulo, isomerizados ou não, reduzidos ou não. Os 97% da produção mundial de lúpulo é consumida pelo mercado cervejeiro (DURELLO, SILVA e JUNIOR, 2019).

O lúpulo é uma planta perene, ou seja, não necessita ser plantada a cada nova safra. Seu ápice de produtividade se dá a partir do terceiro ano, com uma duração comercial que pode chegar a um período de 12 a 15 anos (AGROCLIMA, 2020).

As análises do mercado de lúpulo alemão de setembro de 2020 retrataram um aumento de 7,1% de crescimento nas colheitas, totalizando 48,8 mil toneladas de lúpulo colhido, segundo a Associação de Produtores de Lúpulo da Alemanha, país que é o segundo maior produtor mundial do insumo. A área de cultivo alemã se estende por 20.706 hectares, após um aumento de 14% de área plantada no ano de 2020 (CATALISI, 2020).

Em um relatório emitido pela *HOP GROWERS OF AMERICA*, em janeiro de 2021, a área de plantio do lúpulo nos EUA aumentou 3,73% em 2020 com relação a 2019, totalizando 24.738 hectares, destes 77,8% são plantações de Cultivares de lúpulos de aroma. Entretanto, a produção caiu 7,29% em relação a 2019, isso devido aos impactos causados pela pandemia e aos severos desafios climáticos ocasionados neste período (USAHOPS, 2021). McCallum *et al* (2019) citam que a produção global de lúpulo no Estados Unidos vale aproximadamente 500 milhões de dólares.

No Brasil, para atender a demanda nacional, seriam necessários 25 milhões de pés plantados, a qual neste mesmo período avaliado há somente 15 mil pés,

demonstrando um enorme potencial para o cultivo no país (REVISTA DA CERVEJA, 2019). Para se ter uma ideia da demanda de lúpulo no Brasil, é preciso considerar que o setor cervejeiro produz aproximadamente 14 bilhões de litros de cerveja ao ano e, em função disso, o país ocupou o terceiro lugar de maior importador de lúpulo do planeta. Um levantamento realizado pela Aprodúpulo informa que o Brasil importou 3,6 mil toneladas de lúpulo em 2019 (MAPA, 2020).

A doutora e pesquisadora Mariana Faghrazzi aponta a existência de mais de 260 cultivares de lúpulo catalogados no Brasil, dentre esses, mais de 10 já foram registrados junto ao MAPA (FAGHERAZZI, 2021). A agrônoma ainda afirma que o sucesso do cultivo do lúpulo está vinculado a uma faixa climática próxima aos 18 °C, em uma soma das temperaturas efetivas do ar<sup>2</sup> que varia entre 1.751 °C a 2.900 °C. Este somatório, mencionado pela agrônoma, retrata uma determinada quantidade de energia que o ambiente deverá fornecer diariamente a planta, assim como uma precipitação de no mínimo 300 mm bem distribuída, além é claro da luminosidade.

No último relatório emitido pela BarthHass (BARTHASS, 2020), empresa alemã maior produtora de lúpulo do mundo, a maior parte das 130 mil toneladas colhidas na safra de 2019/2020 são de lúpulos amargos, ou seja, com baixas concentrações de óleos essenciais, acarretando em um excedente de lúpulos de altos teores de alfa ácidos no mercado global. Com o crescente aumento na produção artesanal de cervejas, aumentará a demanda por lúpulos aromáticos, denotando o direcionamento previsto das próximas Cultivares de lúpulos no mercado nacional.

Com isso é importante entender sobre os tipos de lúpulos produzidos no Brasil e no Mundo.

## 2.2 Taxonomia do Lúpulo

Inicialmente eram consideradas somente duas espécies, sendo elas: *Humulus lupulus L.* e a *Humulus lupulus japonicus*, entretanto em 1978, Ernest Small, ao conduzir um estudo detalhado, evidenciou a presença de uma terceira espécie do gênero *Humulus*, a *Humulus yunnanensis Hu*, que até o momento era mal identificada como sendo do *Humulus lupulus L.* Small também subdividiu a espécie *Humulus*

---

<sup>2</sup> Se trata de uma metodologia de medição de graus-dia utilizada na agricultura. Está relacionado com Temperatura de Brotamento e “quantidade de energia ótima” para o desenvolvimento metabólico da planta.

*lupulus* em outras cinco variedades com base em propriedades morfológicas e localização geográfica (DENOMA, 2000). São elas:

- *H. lupulus* var. *lupulus*
- *H. lupulus* var. *cordifolius*
- *H. lupulus* var. *neomexicanus*
- *H. lupulus* var. *puberes*
- *H. lupulus* var. *lupuloides*

Todas as três espécies do gênero *Humulus* citadas anteriormente são trepadeiras herbáceas com pelos de escalada em forma de gancho para agarrar e amarrar no sentido horário as estruturas disponíveis. Elas são dióicas, com plantas masculinas e femininas separadas. As plantas masculinas e femininas são facilmente distinguidas durante a floração, nenhuma outra diferença morfológica identifica o sexo de uma planta. As flores são polinizadas pelo vento e a inflorescência feminina se desenvolve em um "estróbilo", comumente chamado de "cone" (Imagem 01) (DENOMA, 2000).

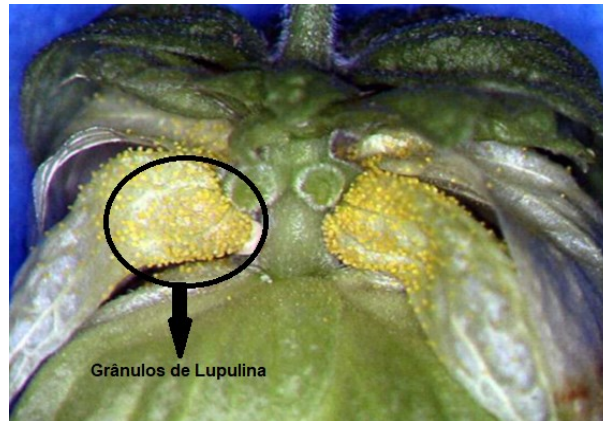
**Imagem 01 - Plantas de lúpulo em floração, a esquerda masculina, direita feminina.**



Fonte: ROCHA (2005).

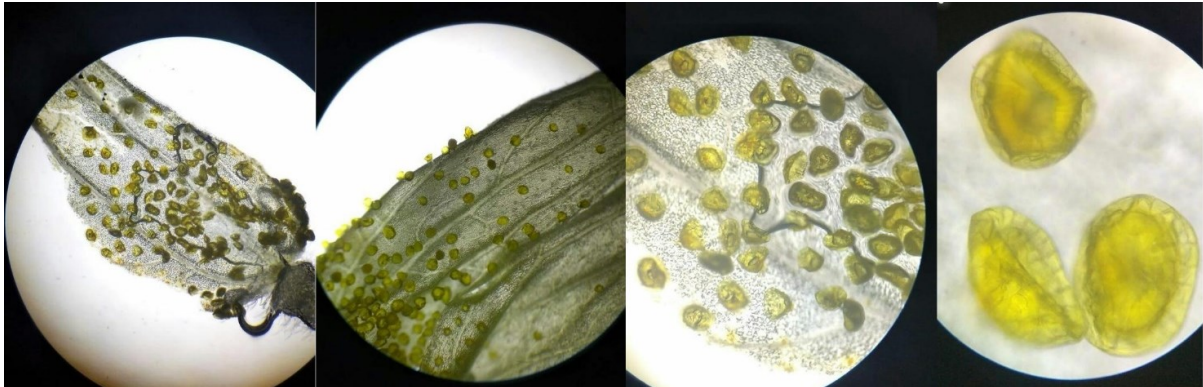
É principalmente nas glândulas da superfície das bractéolas das inflorescências das plantas femininas que são formados os grânulos ou aglomerados de lupulina, como pode se ver nas Imagens 02 e 03. Estas estruturas constituídas por resinas e OE, também são originadas em flores masculinas e nas folhas (NEVE, 1976).

**Imagem 02 - Grânulos de lupulina na superfície exterior das bractéolas**



Fonte: ROCHA (2005).

**Imagem 03 - Aglomerados de lupulina em microscópio.**



Fonte: O autor.

Após a polinização, os estigmas morrem rapidamente e as pequenas inflorescências são estimuladas para um rápido desenvolvimento. O eixo torna-se mais alongado e grosso, as brácteas estipuladas e as bractéolas ampliam e a inflorescência torna-se um estróbilo, também conhecido como cone, devido à sua aparência. Ao mesmo tempo, as pequenas glândulas de lupulina desenvolvem-se rapidamente e aceleram as suas secreções de resinas e de OE. Estas glândulas amarelas douradas se apresentam aglomeradas na superfície exterior da parte mais inferior das bractéolas, bem como toda a superfície do perianto. Algumas glândulas

dispersas podem ser encontradas, ocasionalmente, nas partes inferiores das brácteas estipuladas (BURGESS, 1964).

### 2.3 Variedades do Lúpulo e suas composições

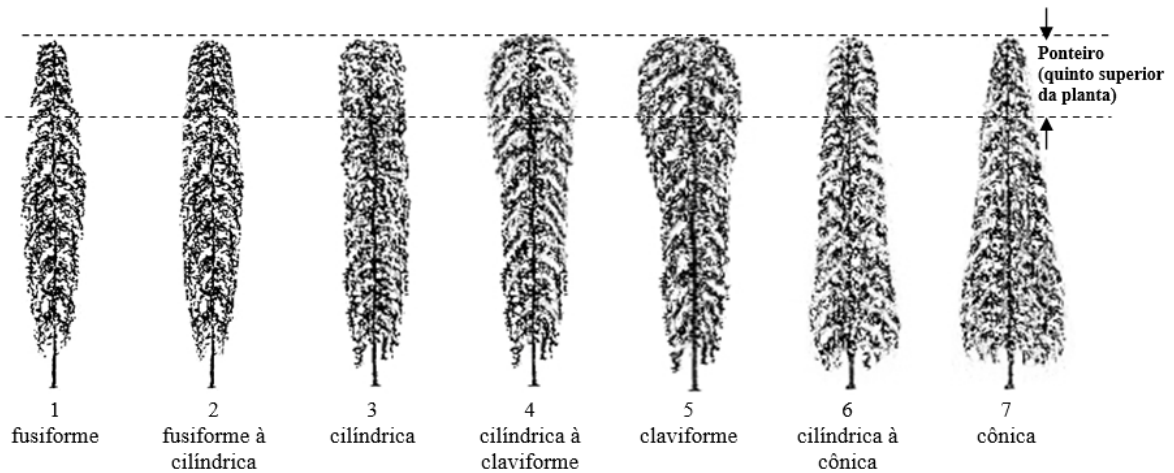
As diferentes variedades de lúpulo são classificadas inicialmente em duas classes, os conhecidos como lúpulos de amargor, que possuem menores teores de óleos essenciais, em contra partida maiores níveis de alfa e beta ácidos (humulonas e lupulonas respectivamente), e, por outro lado, os lúpulos de aroma, os quais possuem maiores teores de OE (EYRES; DUFOUR, 2009).

Esta classificação básica é utilizada para determinar a forma ideal de inclusão do lúpulo no processamento da cerveja, pois os lúpulos de aroma, por exemplo, são geralmente adicionados ao final do processo de fervura do mosto, ou na chamada etapa de *whirlpool* (lupulagem tardia), ou ainda, durante a maturação da cerveja (*dry hopping*). Estes métodos são empregados para evitar as perdas dos compostos voláteis presentes nos OE por ação do calor (BAMFORTH, 2010).

O MAPA estabeleceu, em agosto de 2016, um formulário denominado de “instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de lúpulo (*Humulus lupulus L.*)”, no qual é utilizado como diretriz para caracterizar e distinguir as diferentes cultivares de lúpulo (MAPA, 2016). Este meio de formalizar e caracterizar o cultivar de um produtor permite não somente a credibilidade quanto à qualidade comercial, mas também uma forma de verificação quando o produtor for adquirir uma muda, de uma determinada variedade, para o seu plantio.

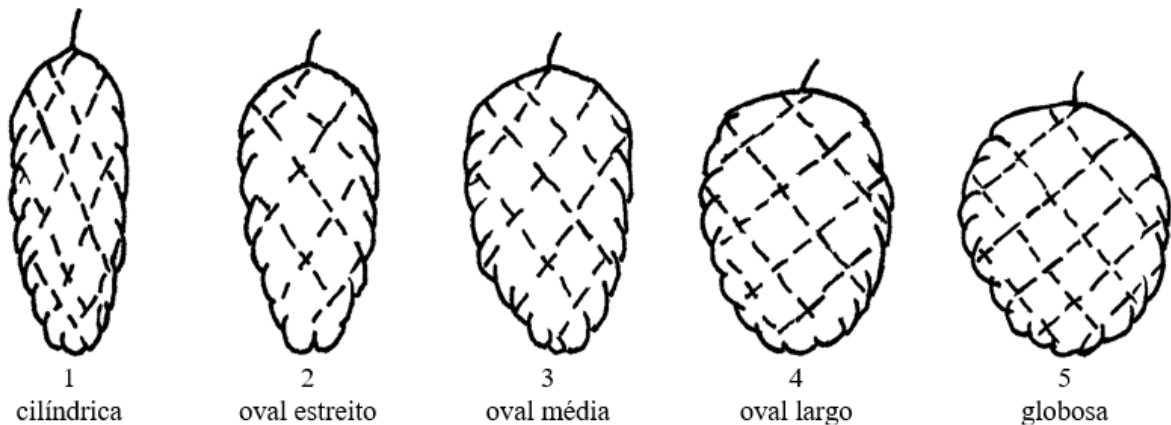
Este formulário descreve as principais características diferenciativas da planta, dentre elas: forma do cone, tamanho do cone, comprimento do ápice das brácteas, tamanho das brácteas, pigmentação antocianínica do caule principal, tamanho da lâmina da folha, ciclo de florescimento, porte da planta, forma da planta e volume do ponteiro (MAPA, 2016). Na Figura 01, pode-se visualizar as diferentes formas da planta estabelecidas pelo formulário, assim como as diferentes formas dos cones na Figura 02 (MAPA, 2016).

**Figura 01 - Tipos de formatos das diferentes variedades de lúpulo.**



Fonte: (MAPA, 2016).

**Figura 02 - Diferentes formatos dos cones de lúpulo.**



Fonte: (MAPA, 2016).

A seguir serão apresentadas as principais características das diferentes cultivares estudadas neste trabalho, bem como uma breve apresentação histórica atual e de sua origem.

### 2.3.1 Cultivares de lúpulos

Os itens abaixo irão relacionar alguns dos principais cultivares produzidos no Brasil, mostrando a diferença de suas composições e funções.

#### 2.3.1.1 Cultivar Centenial

Também conhecida como “Super Cascade”, foi lançada pela primeira vez em 1990 pela Universidade do Estado de Washington como sendo um lúpulo de aroma. Comumente utilizada em cervejas do tipo Ipas Cítricas, assim como a Cascade e a

Citra, é a sexta colocada no quesito área plantada nos EUA em 2020 (USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA, 2021).

É composta de três quartos de Brewer's Gold e pequenas partes de outros cultivares, tais como Fuggle e East Kent Golding (USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA, 2020). Sua composição principal pode ser visualizada na Tabela 01.

**Tabela 01 - Composição química – cultivar Centenial.**

<b>Ácidos Alfa</b>	<b>Ácidos Beta</b>	<b>Cohumulona</b>	<b>OE Totais</b>
9,5 – 11,5 %	3,4 - 4,5 %	29 - 30 %	1,5 - 2,5 ml/100 g
<b>Mirceno</b>	<b>Humuleno</b>	<b>Cariofileno</b>	<b>Farneseno</b>
45 - 55 %	10 - 18 %	5,0 - 8,0 %	<1 %

Características: Cítricas e Florais de média intensidade, lembrando Anis e Camomila.

Fonte: Adaptado de USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA (2020) e BARTHHAAS, (2020).

### 2.3.1.2 Cultivar Comet

É um lúpulo de amargor, que apareceu fora do ranking dos 10 maiores, com apenas 37,63 hectares de área plantada nos EUA em 2020 (USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA, 2021).

Foi lançado como um lúpulo de amargor, com alto teor de ácido alfa, através do programa de desenvolvimento do USDA (*United States Department of Agriculture*) em 1974, através do cruzamento da variedade inglesa Sunshine e a uma variedade nativa da América do Norte, particularmente para a produção em Washington e Idaho (USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA, 2020). Sua composição principal pode ser visualizada na Tabela 02.

**Tabela 02 - Composição química – cultivar Comet.**

<b>Ácidos Alfa</b>	<b>Ácidos Beta</b>	<b>Cohumulona</b>	<b>OE Totais</b>
9,4 - 12,4 %	3,0 - 6,1 %	40 - 45 %	1,4 - 3,3 ml / 100 g
<b>Mirceno</b>	<b>Humuleno</b>	<b>Cariofileno</b>	<b>Farneseno</b>
40 - 65 %	1,0 - 2,0 %	5,0 - 7,0 %	<1%

Características: Cítrico, Terrestre/Tabaco, Tangerina, Capim-limão, Maracujá

Fonte: Adaptado de USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA (2020) e BARTHHAAS, (2020).

### 2.3.1.3 Cultivar Columbus

Esta variedade, também é conhecida pela sigla CTZ, que significa Columbus, Tomahawk e Zeus, e está em segunda colocação no ranking de 2020 no quesito área

plantada nos EUA (USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA, 2020). Normalmente utilizada na fabricação de cervejas de estilos Ales americanas, Pale Ale, Indian Pale Ale, Stout, Barley Wine, Lagers.

É conhecida como uma variedade de amargor Super High Alpha, ou seja, com altos teores de alfa ácidos, que variam entre 14 e 17 %, possui a variedade Nugget como o seu progenitor feminino (USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA, 2020). Sua composição principal pode ser visualizada na Tabela 03.

**Tabela 03 - Composição química – cultivar Columbus.**

<b>Ácidos Alfa</b>	<b>Ácidos Beta</b>	<b>Linalol</b>	<b>OE Totais</b>
15,0 – 17,0%	4,5 - 5,0 %	0,20%	2,5 - 3,5 ml / 100 g
<b>Mirceno</b>	<b>Humuleno</b>	<b>Cariofileno</b>	<b>Farneseno</b>
50 - 60 %	12 -18 %	9,0 - 11,0 %	<1%

Características: De amargor com aroma picante.

Fonte: Adaptado de USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA (2020) e BARTHHAAS, (2020).

#### *2.3.1.4 Cultivar H-Mitt*

A variedade Hallertau, também se apresenta fora do ranking das 10 maiores áreas plantadas nos EUA em 2020, com 64,34 hectares de área plantada. Foi criada no Instituto de Pesquisa Hüll Hop na Alemanha para resistir a doenças. Por ser um lúpulo de aroma, é normalmente usada em cervejas Lagers Estilo Alemão, Trigo, Pilsners. (USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA, 2021).

A H. Tradition é uma variedade fabricada em Huell, pode ser comparada à Hallertauer Mittelfrueh e se destaca devido aos bons rendimentos que se mantêm estáveis mesmo durante anos com climas difíceis (USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA, 2021).

A Hallertau possui diversas cultivares próximas, dentre elas as H. Blanc e H. Magnun que são produzidas na Alemanha. Pode-se ver algumas diferenças composicionais das suas variantes na Tabela 05 a seguir (BARTHHAAS, 2020). A sua composição geral pode ser visualizada na Tabela 04.



Tabela 04 - Composição química – cultivar H-Mitt.

Ácidos Alfa	Ácidos Beta	Cohumulona	OE Totais
3,5 a 6,5%	2,5 – 6,5%	18 - 28% dos Alfa-Ácidos	0,5 - 1,0 ml/100g
Mirceno	Humuleno	Cariofileno	Farneseno
55 - 60%	45 - 55%	10 - 15%	<1%

Características: Suave, picante, herbal, floral.

Fonte: Adaptado de USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA (2020) e BARTHHAAS, (2020).

Tabela 05 - Comparação da composição química – cultivar H-Mitt.

OE Totais	Mirceno	Humuleno	Cariofileno	Farneseno	Linalol	Geraniol	Terpenos Álcoois e Ésteres	Iso butiratos	Tióis (µg/Kg)
Hallertau Callista	46,96	17,31	4,42	0,12	1,19	0,04	1,10	0,90	8,62
Hallertau Ariana	44,95	18,13	4,84	0,02	0,36	0,13	2,77	1,99	10,35
Hallertau Perle	27,32	41,37	12,80	0,01	0,15	0,05	1,37	0,87	0,00
Hallertau Hal. Tradition	35,51	34,97	9,44	0,06	0,81	0,03	1,08	0,78	0,00
Hallertau Mandarina Bavaria	32,84	13,86	3,74	1,29	0,22	0,26	1,34	1,48	7,14

Fonte: BARTHHAAS (2020).

### 2.3.1.5 Cultivar Chinook

Chinook foi a nona colocada no quesito área plantada nos EUA em 2020, desenvolvida pelo programa de fabricação do USDA no estado de Washington e lançada em 1985 como uma variedade de amargor, ou seja, com alto teor de ácidos alfa. O seu genitor fêmea é um English Goldings (USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA, 2021). Sua composição principal pode ser visualizada na Tabela 06.

Tabela 06 - Composição química – Cultivar Chinook.

Ácidos Alfa	Ácidos Beta	Cohumulona	OE Totais
11,7 -12,7 %	3,0 - 4,0 %	29 - 35 % dos ácidos alfa	1,7 -2,7 ml/100 g
Mirceno	Humuleno	Cariofileno	Farneseno
35 -45 %	18 - 23 %	9,0 -11,0 %	<1%

Características: Intensidade média cítrica, picante, pinho, frutas vermelhas.

Fonte: Adaptado de USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA (2020) e BARTHHAAS, (2020).

### 2.3.1.6 Cultivar Cascade

Esse cultivar foi criado pela USDA em Oregon nos Estados Unidos em 1972, através do cruzamento da Fuggle Inglesa com uma planta macho da variedade russa Serebrianka. Comumente utilizada em cervejas do tipo American Ale, India Pale Ale, e Porter. Segundo o relatório de estatístico de 2020 da *Hop Growers of America*, a Cascade deteve a primeira colocação de 2015 a 2017 com relação a área plantada nos Estados Unidos, e, em 2020, caiu para a quinta colocação com um total de 47 mil toneladas colhidas. (USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA, 2021). Sua composição principal pode ser visualizada na Tabela 07.

**Tabela 07 - Composição química – Cultivar Cascade.**

<b>Ácidos Alfa</b>	<b>Ácidos Beta</b>	<b>Linalol</b>	<b>OE Totais</b>
4,5 – 7,0 %	4,8 – 7,0 %	0,3 - 0,6%	1,3 ml/100 g
<b>Mirceno</b>	<b>Humuleno</b>	<b>Cariofileno</b>	<b>Farneseno</b>
45 – 60 %	18 - 23 %	3,0 - 6,0 %	3,0 – 7,0 %

Características: Floral, especiarias, frutas cítricas, laranja.

Fonte: Adaptado de USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA (2020) e BARTHHAAS, (2020).

## 2.4 Óleo essencial

O termo "óleos essenciais" (OEs) surgiu com a crença popular de que os "óleos" são essenciais para a vida, além de possuírem uma longa história de uso por humanos para fins cosméticos e medicinais. O desenvolvimento de óleos essenciais, no entanto, foi retardado pelo advento dos antibióticos em meados do século XIX, e foi renovado recentemente. Estima-se que, de 3.000 OE conhecidos, 300 foram reconhecidos como comercialmente importantes e usados principalmente no mercado de sabores e fragrâncias (ZHAI, 2018).

Óleos essenciais são extratos de plantas compostos por uma combinação de substâncias que, em sua maioria, são voláteis, e comumente obtidos através de procedimento de arraste a vapor. OEs podem afetar a permeabilidade bacteriana e sobrevivência, seja por contato direto ou por contato com vapor, com isto possuem aplicação direta na conservação de alimentos e desinfecção de superfícies. A composição complexa e diferentes mecanismos de ação dos OEs podem ser uma vantagem sobre outros antimicrobianos, prevenindo o desenvolvimento de resistência de bactérias (AGUIAR *et al.*, 2018).

Os OEs são constituídos, em sua maioria, de mono e sesquiterpenos, fenilpropanóides, fenóis, ésteres e outras substâncias de baixo peso molecular, substâncias originárias de metabólitos secundários que conferem as características organolépticas de suas respectivas plantas, que são associadas ao conjunto de vários componentes (BIZZO, 2009).

Ribeiro (2018) os define como aditivos conservantes, aqueles munidos de ação antimicrobiana, bem como os aditivos antioxidantes, capazes de conservar as gorduras presentes nos alimentos, essa conservação está projetada conforme a capacidade de inibição da ação de oxirredução que ocorre com as gorduras.

#### 2.4.1 OE de lúpulo

Sharp *et al* (2014) mencionam em seu texto que muitos trabalhos vêm sendo realizados buscando obter uma melhor compreensão de quais compostos do lúpulo, e de como eles influenciam no sabor da cerveja. Vários destes compostos estão presentes em concentrações muito abaixo dos limites de detecção sensorial, entretanto contribuem significativamente no perfil do aroma, denotando um efeito sinérgico aos outros compostos, ou mesmo através de uma biotransformação durante o processo de fermentação ou aquecimento.

Em um artigo redigido por Harold Weissler, na Reunião Anual da Sociedade Americana dos Químicos de Fabricação de Cerveja (ASBC), em 1954, inclui o óleo essencial como sendo um dos constituintes do lúpulo da lista de mais importantes para a elaboração da cerveja (WEISSLER, 1954).

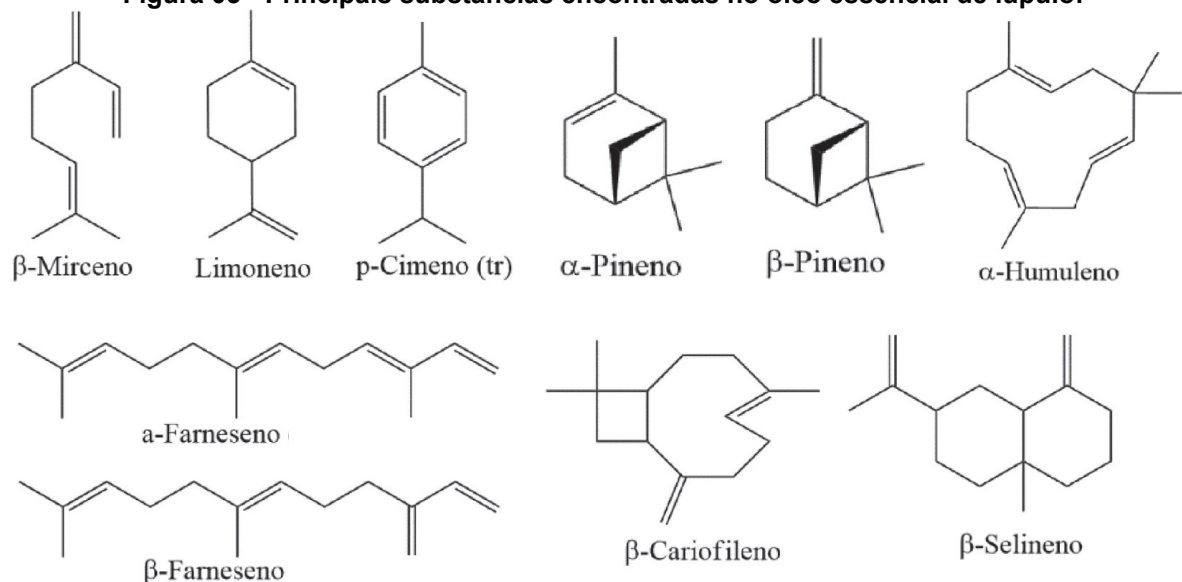
Algumas cervejarias optam pela utilização do OE de lúpulo ao invés de seus cones, sejam *in natura* ou peletizados, com intuito de melhorar o aroma e diminuir amargura, isto pois, as substâncias que concedem aroma e sabor são encontradas em sua maioria nos OE, bem como, as substâncias que causam amargor conhecidas como  $\alpha$  e  $\beta$  ácidos do lúpulo não estão presentes no OE (CRONIN; RODRIGUEZ; WESTERFIELD, 2015).

Os OE são usualmente responsáveis por cerca de 0,5 a 3,0% do peso do cone seco. Contudo, dependendo da variedade e das condições de crescimento, já foram obtidos valores entre 0,1 a 2%, dos quais 0,3 a 1% nos estróbilos e 1 a 2% nas glândulas. Nos óleos essenciais de lúpulo já foram identificados cerca de 300 compostos diferentes ao longo dos diferentes cultivares (PARKES, 2020).

As proporções individuais dos constituintes na composição de OE são, obviamente, dependentes de cada variedade e, conseqüentemente, vai influenciar no aroma do lúpulo. Um dos critérios para avaliar a qualidade do lúpulo é o aroma que deriva exclusivamente dos OE (PARKES, 2020).

Os hidrocarbonetos constituem uma classe de OE quimicamente conhecidos por terpenos: monoterpenos, como o mirceno; diterpenos, como o dimirceno; e sesquiterpenos, como o farneseno, o humuleno, o cariofileno, o selenino e o limoneno. O mirceno, o humuleno, o cariofileno e o farneseno constituem cerca de 80% do total do OE da maioria dos cultivares de lúpulos frescos (PARKES, 2020). Algumas das principais substâncias presentes no OE de lúpulo estão esquematizadas na Figura 03 a seguir.

**Figura 03 - Principais substâncias encontradas no óleo essencial de lúpulo.**



**Fonte: o autor.**

Dentre os terpenos mencionados, o mirceno merece destaque pois, na maioria dos cultivares de lúpulo, se faz presente como componente majoritário, podendo ser considerado como componente mais importante do OE, podendo o seu conteúdo variar dentre 20 a 65%, empregando notas de aroma herbáceo e verde fresco (DURELLO, SILVA e JUNIOR, 2019).

Já o cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico, que induz a sensibilidade de odores como amadeirado, apimentado e floral. Além deste tem-se o farneseno,

sesquiterpeno responsável pela sensibilidade de odores com características de amadeirado, cítrico e adocicado (SHARP, *et al* 2014).

O humuleno, em termos de conteúdo, em algumas variedades, pode igualar ou mesmo exceder a quantidade de mirceno, mas, em geral, o seu conteúdo é de 15%. O cariofileno constitui 5 a 15% dos óleos essenciais. O farnaseno, dependendo da variedade, a sua fracção correspondente pode variar de <1 a 20% (DURELLO, SILVA e JUNIOR, 2019).

A classe de hidrocarbonetos oxigenados vai aumentando com o tempo de armazenamento do lúpulo, à medida que os componentes vão oxidando. O armazenamento inadequado do lúpulo pode resultar em lúpulos que contenham cerca de 50% destes compostos. Os hidrocarbonetos, o mirceno, em particular, são susceptíveis à oxidação (DURELLO, SILVA e JUNIOR, 2019).

Estes compostos, que consistem o grupo de terpenos oxidados, podem ser classificados em: álcoois (tais como linalol e geraniol), ésteres (tal como acetato geranil), aldeídos e cetonas. Como algumas destas substâncias são poderosos agentes aromáticos, alguns fabricantes de cerveja envelhecem deliberadamente o lúpulo, para realçar estas qualidades (PARKES, 2020).

Os compostos orgânicos, que contêm enxofre, são encontrados em quantidades mínimas na composição do OE do lúpulo, mas também podem ser considerados potentes agentes aromatizantes. A este grupo correspondem uma série de hidrocarbonetos que se combinam com o enxofre, podendo ser episulfuros, tio-ésteres e polisulfuros (PARKES, 2020).

#### 2.4.2 Métodos de obtenção do óleo essencial

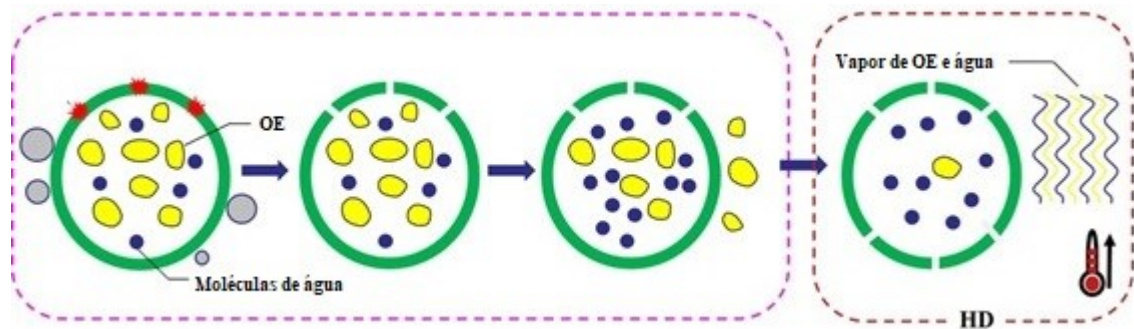
Os métodos, que serão citados a seguir, possuem como base os princípios da destilação, onde a miscibilidade e imiscibilidade dos componentes envolvidos provocam os resultados da separação (CONSTANTINO; SILVA; DONATE, 2004). De acordo com a Sociedade Brasileira de Farmacognosia (2019), o método de extração de Cleverger aplicado a OEs consiste em um sistema de extração por arraste a vapor ou por hidrodestilação.

O calor resultante no processo de extração é capaz de provocar o rompimento dos tricomas e conseqüentemente liberação dos óleos essenciais presentes nas

plantas. Estes, por consequência da sua miscibilidade parcial com a água, são arrastados para o sistema de condensação (WOLFFENBÜTTEL, 2007).

Na Figura 04, adaptada de Chen *et al* (2020), é possível elucidar o modo como ocorre o processo de extração de OE em vegetais. Neste esquema visualiza-se o rompimento da estrutura do tecido vegetal dos tricomas, a entrada de moléculas de água, a saída das substâncias voláteis e o arraste destas pelo vapor d'água.

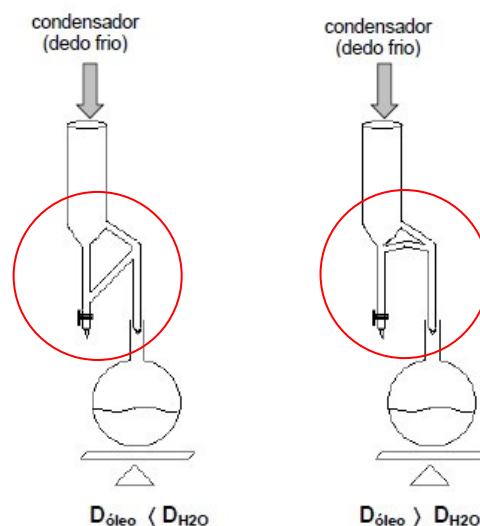
**Figura 04 – Esquema da extração molecular dos óleos essenciais.**



Fonte: Chen, et al (2020).

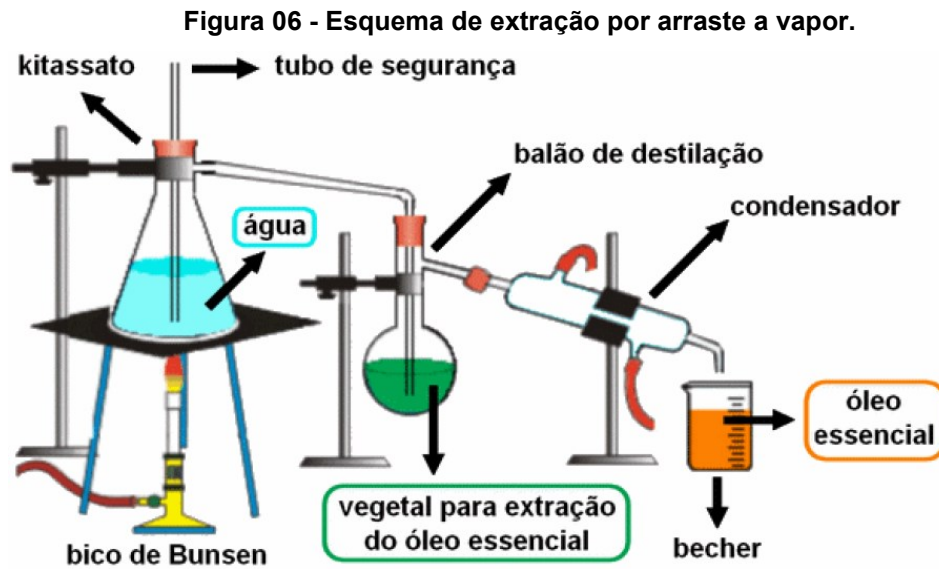
Após a condensação da solução, o OE é separado da água espontaneamente por um sistema de decantação em um tubo, que pode ser graduado ou não, e que possui um retorno da água ao sistema de aquecimento. Este método depende diretamente da densidade específica do óleo a ser extraído, definindo assim o formato adequado (Figura 05).

**Figura 05 – Aparelho de extração de OE tipo Clevenger**



Fonte: Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 2019

O arraste a vapor é um método muito parecido com a hidrodestilação, é possível visualizar na Figura 06, que a matriz vegetal possui contato direto somente com o vapor d'água, ao contrário da hidrodestilação onde a matriz vegetal permanece submersa durante o processo (CONSTANTINO; SILVA; DONATE, 2004).



Fonte: (TRANCOSO *et al*, 2013)

A escolha do método deve levar em consideração a área de contato da planta, fragmentada ou não, levando em conta o mínimo de água necessário para o processo, bem como a menor temperatura de trabalho, evitando assim possíveis degradações e decomposições do óleo essencial (CONSTANTINO; SILVA; DONATE, 2004).

### **3. METODOLOGIA**

Neste capítulo estão descritas as técnicas adotadas para avaliação e preparo das amostras dos diferentes cultivares de lúpulo, bem como para otimização da metodologia de extração e da caracterização dos OEs de lúpulo.

Os cones utilizados para avaliação do OE foram obtidos de um fornecedor oriundo da cidade de Lapa, do estado de São Paulo, produção do primeiro semestre de 2020.

As amostras foram recebidas acondicionadas lacradas em saco plástico de polietileno, dentro de outro saco plástico com revestimento externo e interno metalizado, impossibilitando a degradação luminosa durante a armazenagem. Estas amostras passaram por processo de secagem em larga escala realizada pelo próprio fornecedor.

#### **3.1 Microscopia óptica dos cones de lúpulo**

Para uma verificação inicial das condições de estruturação física das plantas avaliadas, algumas brácteas, escolhidas ao acaso, foram dispostas sobre um vidro relógio, e com o auxílio de um microscópio OLEN k55BA, utilizando-se aumento das objetivas em 1 e 2 vezes (1X e 2X) observou-se a presença dos grânulos de lupulina.

Esta avaliação possui o intuito de monitorar possíveis destruições estruturais das plantas, causadas pela manipulação excessiva do fornecedor, bem como um comparativo das estruturas vegetais das diferentes amostras, identificando como foco principal os aglomerados de lupulina presentes na superfície vegetal, e excessos de rompimento da superfície fibrosa vegetal, assim como foram conduzidos os experimentos realizados por Kupski (2015).

#### **3.2 Teor de Umidade da Planta**

Utilizou-se cerca de 1,0 g de amostra das Cultivares estudadas para monitoramento do teor de umidade. As análises foram realizadas em triplicata em todos os dias de extração, isto devido às possíveis variações de umidade relativa do ar e da temperatura dos diferentes dias necessários para realização dos ensaios de extração.



A umidade foi obtida por uma balança determinadora de umidade infravermelho modelo I-thermo 621 marca BEL Engineering. Este equipamento mostra-se como alternativa aos métodos estabelecidos pelo padrão Hop-4 (ASBC, 2008).

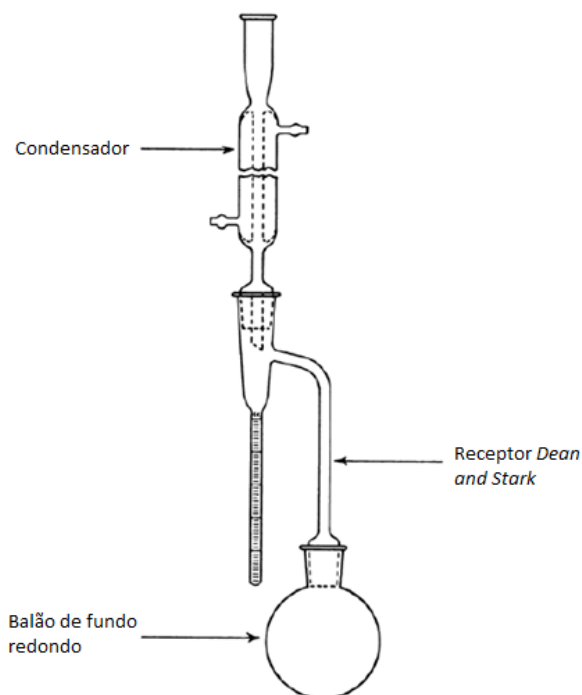
Para um modelo comparativo e validação do uso do equipamento no monitoramento dos teores de umidade no lúpulo, foi proposto a realização da medição de umidade em triplicata das amostras, utilizando-se 2,5 g de amostra de cada cultivar, submetida à estufa modelo SEA 11L marca 7Lab a 103 °C por 1 hora, conforme cita a metodologia Hop-4.

O cálculo da umidade é realizado através da equação 01 a seguir:

$$Umidade (\%) = \frac{Massa\ perdida\ na\ secagem\ (g)}{Massa\ da\ amostra\ de\ lúpulo\ (g)} \times 100 \quad (01)$$

Outro modelo comparativo utilizado a partir do método Hop-4, foi através de uma destilação azeotrópica utilizando 10 g de amostra de cada variedade de lúpulo e 150 mL de Tolueno PA (marca Anidrol), submetidos ao processo de destilação por 90 minutos em aparato utilizando um Receptor de destilação modelo “Dean and Stark” mostrado conforme Figura 07.

**Figura 07 - Aparelho para destilação azeotrópica.**



**Fonte: Farmacopeia, 2010.**

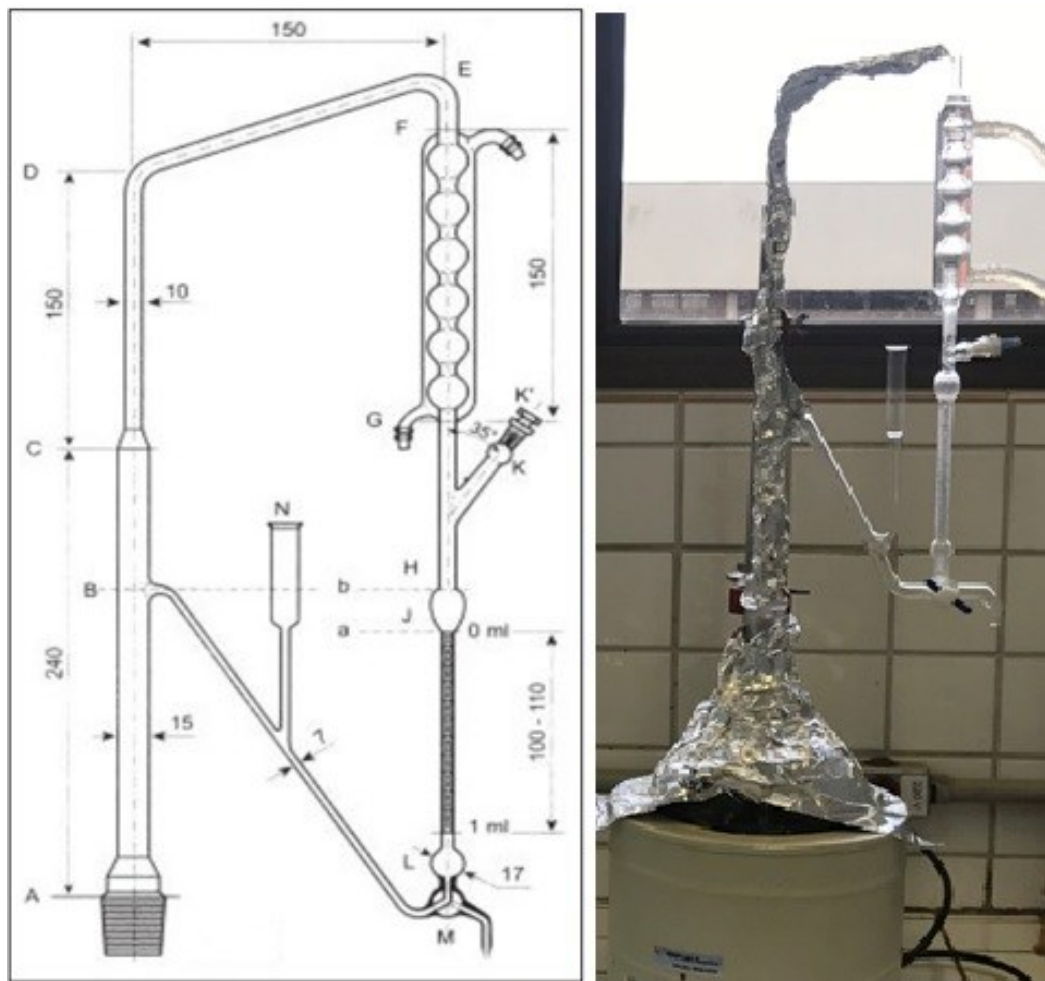
O cálculo da umidade é realizado através da equação 02 a seguir:

$$Umidade (\%) = \frac{Volume\ do\ receptor\ (mL)}{Massa\ da\ amostra\ de\ lúpulo\ (g)} \times 100 \quad (02)$$

### 3.3 Extração do OE de lúpulo.

Os cones foram submetidos ao processo de extração por hidrodestilação, utilizando os dois formatos de aparelhos indicados pela Farmacopeia (2019). Na Figura 08 visualizamos o equipamento 01, este aparato apresenta um sistema fechado contendo um condensador de bolas, diferentemente do equipamento 02 apresentado a seguir.

Figura 08 - Vidraria de obtenção de óleo essencial - sistema Farmacopeico (Equipamento 01).

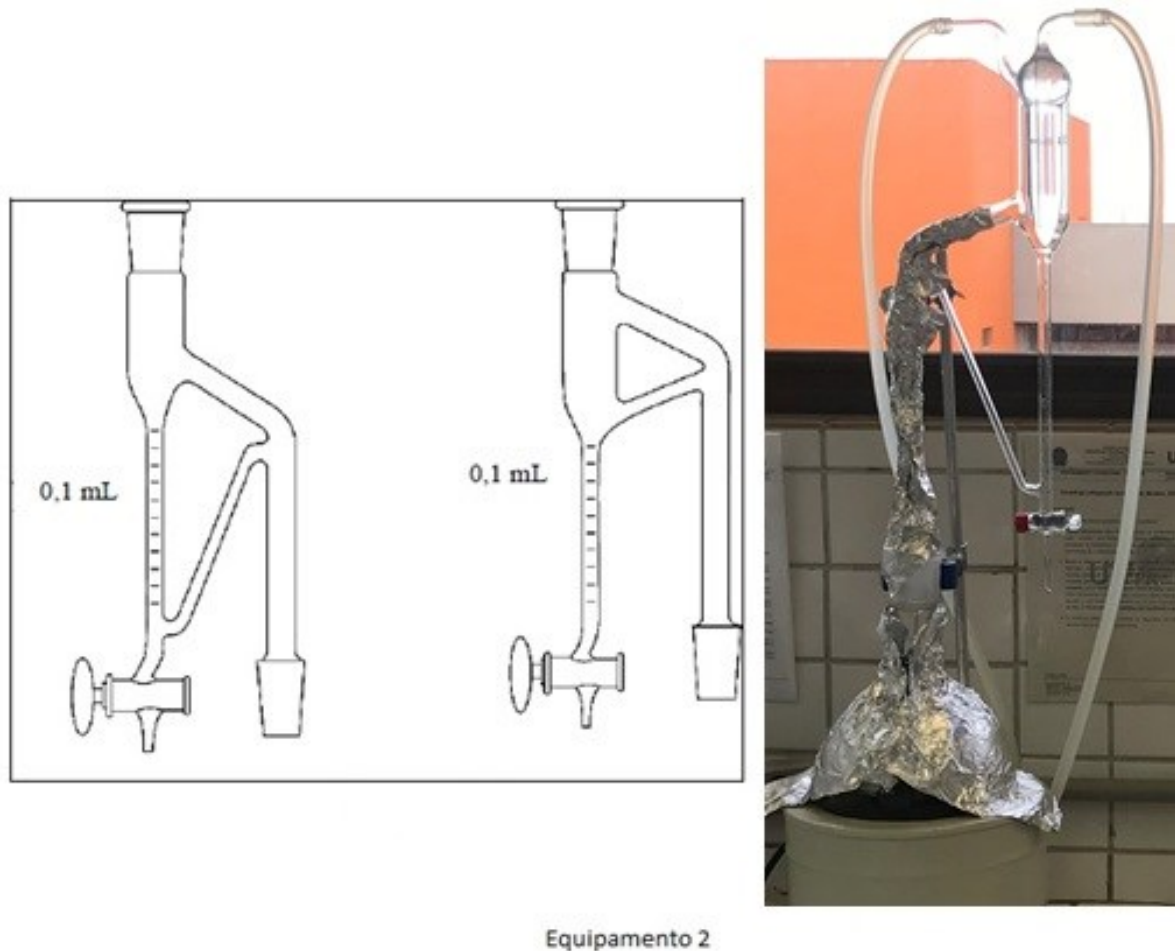


Equipamento 1

Fonte: Farmacopeia (2019).

Na Figura 09, pode-se visualizar o aparelho tipo Clevenger, a qual o aparato de condensação é encaixado na parte superior. O processo se decorreu utilizando variações de quantidades e tempos de acordo com o planejamento experimental descrito no tópico posterior.

**Figura 09 - Vidraria de obtenção de óleo essencial - sistema Clevenger (Equipamento 02).**



**Fonte: O autor.**

O método Hops-13 da ASBC (2008), também citado por SHARP et al. (2014) para a quantificação do OE de lúpulo, determina a utilização de 30 mL de água deionizada por grama de planta. Partindo deste valor, a quantidade de água foi fixada em 600 mL, variando somente as quantidades de matéria vegetal a partir de um padrão ideal de trabalho como sendo 20 g pré-estabelecido, visando a diminuição da amostra e do tempo demandados para extração.

### 3.4 Planejamento Experimental

O planejamento fatorial é uma técnica quimiométrica utilizada para reduzir os ensaios experimentais a fim de atingir resultados confiáveis com o menor número de testes necessários (BADR, AL-QAHTANI, MAHMOUD; 2020).

Inicialmente aplicou-se um teste prévio com a cultivar Cascade, num total de 9 extrações para avaliar preliminarmente o comportamento das alterações propostas. As condições dos experimentos estão descritas na Tabela 08.

**Tabela 08 - Planejamento das extrações de OE para testes prévios.**

Amostra	Tempo (h)	Massa de lúpulo (g)
Padrão	4	100
Clevenger - 01	3	10
Clevenger - 02	3	10
Clevenger - 03	3	10
Clevenger - 04	4	10
Farmacopeico - 01	3	10
Farmacopeico - 02	3	10
Farmacopeico - 03	3	10
Farmacopeico - 04	4	10

Fonte: O autor.

O estudo foi adaptado de MILLIGAN et al (2012) com 5 diferentes cultivares de lúpulo. Para os experimentos os fatores tempo de extração, massa de planta e cultivar de lúpulo foram consideradas como as variáveis independentes, foco da pesquisa.

Devido à quantidade limitada de amostra disponível para os experimentos, aplicou-se um planejamento fatorial  $2^3$ , considerando os 3 fatores citados anteriormente, sendo 2 fatores de 2 níveis e 1 fator contínuo de níveis variáveis, aplicados para os experimentos realizados com o equipamento Clevenger, conforme demonstrado na Tabela 09, totalizando 20 experimentos, sendo 4 para cada cultivar diferente de lúpulo.

**Tabela 09 - Níveis codificados e suas respectivas variáveis reais - Clevenger.**

Variáveis Independentes	Níveis codificados e reais das variáveis independentes				
Código	-1		1		
Variável Tempo (h)	1		3		
Variável Massa (g)	10		20		
Variável Cultivar	Centenial	Comet	Chinook	H-Mitt	Columbus

Fonte: O autor.

Em seguida, para o equipamento Farmacopeico repetiu-se o planejamento fatorial anteriormente citado para o equipamento Clevenger, entretanto utilizou-se valores menores para as mesmas variáveis definidas. Este fato foi estabelecido devido à quantidade limitada de amostra, bem como uma otimização de operação baseada nos resultados obtidos com os experimentos do equipamento Clevenger, conforme demonstrado na Tabela 10.

**Tabela 10 - Níveis codificados e variáveis reais - Farmacopeico.**

Variáveis Independentes	Níveis codificados e reais das variáveis independentes				
Código	-1		1		
Variável Tempo (h)	0,43		2		
Variável Massa (g)	7,07		15,00		
Variável Cultivar	Centenial	Comet	Chinook	H-Mitt	Columbus

Fonte: O autor.

A variável dependente para os planejamentos propostos foi definida como sendo o rendimento de óleo essencial obtido para cada ensaio, calculado em base seca da amostra avaliada, ou seja, excluindo-se da massa de material vegetal a massa de umidade.

Os resultados foram analisados utilizando o software *Minitab*<sup>®</sup> 18, através de uma análise de variância (ANOVA) para estimar os parâmetros estatísticos e avaliar a predição ou não do modelo matemático.

### 3.5 Caracterização do OE de lúpulo

#### 3.5.1 Determinação da Densidade Relativa ( $D_{20}^{20}$ )

Pesou-se o OE em uma balança analítica SHIMADZU, modelo ATY224, utilizando-se uma micropipeta KASVI modelo K1-100A com faixa de ação entre 10 a 100  $\mu$ L, calibrada com água destilada, sendo uma forma adaptada da FARMACOPEIA (1988).

A partir do princípio de densidade (massa/volume), foi possível obter as densidades específicas do OE, mesmo princípio utilizado por Santos (2014). A relação entre a massa da amostra e a massa da água, ambas em mesma temperatura, representa a densidade relativa da amostra ensaiada. A densidade relativa é denotada

utilizando-se a água como substância padrão de comparação de acordo com ANVISA (2007).

### 3.5.2 Determinação do Índice de Refração

O Índice de refração é uma importante constante óptica das substâncias, ao qual pode ser utilizado para determinação de pureza e concentração de forma qualitativa. Nos ensaios, esse índice foi determinado utilizando-se um aparelho refratômetro de Abbe, marca DIGIT, de acordo com a metodologia descrita pela norma NBR 5785 – Óleos essenciais – determinação do índice de refração (ABNT, 1985). Calibrando-se o refratômetro com água destilada, ajusta-se às condições experimentais inserindo com o auxílio de uma pipeta, uma gota do líquido a ser mensurado, em seguida fecha-se os prismas que compõem o instrumento e realiza-se a leitura pela escala do aparelho.

### 3.5.3 Quantificação e Identificação dos compostos do OE

A análise de caracterização do OE de lúpulo foi realizada no Laboratório de Análises da Embrapa Agroindústria de Alimentos localizado no Rio de Janeiro, baseada na metodologia utilizada por Bizzo, *et al* (2020). Conduziu-se a análise quantitativa dos componentes do OE utilizando um cromatógrafo de fase gasosa com detector por ionização de chama (CG/FID) marca PerkinElmer, modelo Clarus 680, equipado com coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i.) com fase estacionária Elite-5 (5% de difenil e 95% de dimetil polisiloxano) de 0,25 µm de espessura do filme; gás de arraste hidrogênio, ajustado para fornecer uma vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 °C e 250 °C, respectivamente, o tipo de injeção: com divisão de fluxo na razão de 1:40. Foi injetado 1,0 µL de uma solução (2,0 µL de óleo: 1,0 mL n-heptano). A temperatura do forno foi programada para 80 – 240 °C (4 °C min<sup>-1</sup>).

Conduziu-se a análise de identificação dos componentes do OE utilizando alíquotas de 1,0 µL de uma solução a 0,1 % do OE em hexano PA, acrescida do padrão interno de octanoato de metila foram injetadas em triplicata em um cromatógrafo Agilent 7890A, com injetor automático 7693 operando no modo com

divisão de fluxo (split 1:20 ou 1:50) a 250 °C. Para a separação dos componentes foi utilizada coluna capilar de sílica fundida DB-5MS com fase estacionária 5%-fenil-95%-metilsilicone (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), com programação de temperatura de 60 a 240 °C com variação de 3 °C min<sup>-1</sup> e hidrogênio como gás de arraste (1,5 mL min<sup>-1</sup>). As concentrações dos componentes foram calculadas a partir da área normalizada e corrigida (área %) geradas por um detector de ionização por chama (DIC) operando a 280 °C.

Para a identificação dos constituintes foi utilizado um sistema cromatográfico de fase gasosa Agilent, modelo 6890, acoplado a um espectrofotômetro de massas Agilent, modelo 5973N, equipado com um injetor automático 7693, operando nas mesmas condições acima citadas, mas empregando He (hélio) como gás de arraste. Os índices de retenção linear foram calculados utilizando-se mistura de n-alcenos (8 a 26 carbonos) e os espectros obtidos foram comparados conforme descrito por (2017).

A validação dos compostos se deu através da compatibilidade com o banco de dados, tanto dos índices de retenção, quanto os espectros formados através de planilhas eletrônicas conforme menciona a metodologia utilizada por Bizzo, *et al* (2020).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo estão expressos e discutidos os resultados evidenciados durante o processo de otimização da metodologia de quantificação de OE do lúpulo.

Um fator importante encontrado no presente estudo, se deve ao fato de que as amostras recebidas não possuíam informações essenciais como: idade da planta, condições de cultivo, condições ambientais de cultivo, confirmação genético-botânica. Tais informações, são de veras essenciais para análise das possíveis variações de concentração e característica dos OEs. Sabe-se somente que a colheita das amostras foi realizada na segunda produção das respectivas plantas.

Outro fator importante a ser mencionado sobre a etapa de preparação das amostras, foi a não realização do processo de moagem conforme cita o método padrão Hops-13 da ASBC (2008). Como as amostras utilizadas não eram peletizadas, ou seja, eram compostas por cones íntegros, elas somente sofreram um processo de desmembramento foliar, através de um corte manual com tesoura, evitando possíveis perdas oriundas do tritramento em um equipamento, ocasionando um possível pré-rompimento dos tricomas, e conseqüentemente perdas de OE no equipamento de moagem.

A quantidade de água utilizada no processo de extração de óleo essencial do diferentes cultivares do lúpulo foi fixada a um valor próximo a metodologia padrão estabelecida pela ASBC (2008). Esta variável não foi considerada nos estudos, visto que a quantidade de água a ser utilizada no processo de extração está diretamente ligada ao aparato utilizado, bem como a metodologia de processamento da amostra, ou seja, o uso de um equipamento diferente, possivelmente também o de escala industrial, estará condicionado a uma quantidade diferente de água. A otimização da quantidade de água a ser utilizada é um fator de importância, principalmente na aplicação comercial do processo, porém é algo a ser realizado em especificidade de cada equipamento e processo, não sendo o foco do atual estudo.

Kupski (2015) cita a importância da otimização da quantidade de água utilizada para a extração de OE através da metodologia de hidrodestilação, ressaltando que a quantidade de água avaliada está diretamente ligada ao contato superficial com a planta, ou seja, esta quantidade é diretamente influenciada pela morfologia da amostra de matéria vegetal a sofrer o processo de extração, seja ela íntegra, cortada ou moída.



## 4.1 Testes Preliminares

Inicialmente realizou-se um teste prévio, para isto, utilizou-se a cultivar Cascade devido à sua maior quantidade de amostra disponível, obtida juntamente com as demais sob as mesmas condições de aquisição do produtor.

### 4.1.1 Extração de OE de lúpulo

Para a realização destes experimentos preliminares, optou-se pela execução de triplicatas para cada equipamento testado (Clevenger Padrão e Sistema Farmacopeico), todos nas mesmas condições de extração, com o objetivo de comparar os equipamentos/vidrarias, bem como a redução do tempo e da quantidade de matéria vegetal para análise. Nestes testes optou-se pelo uso de 10 g e o tempo de extração de 3 h para quantificação do OE de lúpulo, diferentemente do que é indicado pela metodologia padrão a fim de reduzir gastos com matéria-prima e energia.

Em paralelo realizou-se uma extração comparativa utilizando a metodologia padrão Hops-13 da ASBC (2008) com 100 g de lúpulo durante 4 h, assim como uma extração com 10 g e 4 h, ambas com o equipamento Clevenger, totalizando 09 experimentos apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11 - Comparação de quantificação de OE por Clevenger e Farmacopeico.**

<b>Amostra</b>	<b>Massa de lúpulo (g)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>Rendimento em Base Seca (BS) (%)</b>
Padrão	1000	4	1,23
Clevenger - 01	10	3	0,76
Clevenger - 02	10	3	0,74
Clevenger - 03	10	3	0,76
Clevenger - 04	10	4	0,84
Farmacopeico - 01	10	3	0,81
Farmacopeico - 02	10	3	1,05
Farmacopeico - 03	10	3	0,75
Farmacopeico - 04	10	4	1,45

**Fonte: O autor.**

A partir dos resultados na Tabela 12, foi possível obter as concentrações, variável dependente do estudo, originadas pela massa de OE recuperada após o processo de extração, considerando a base seca da amostra vegetal. Visualiza-se as

médias de 0,757 e 0,871 % para as quantificações feitas com os equipamentos Clevenger e Farmacopeico com extrações de 3 horas, respectivamente. Estes valores denotaram C.V. de 1,48 e 17,68 % para o equipamento Clevenger e Farmacopeico respectivamente. Um alto valor de C.V. para o equipamento Farmacopeico denota uma menor homogeneidade na obtenção dos dados, fato a qual pode ser compreendido pela oportunidade de melhoria na estrutura do equipamento.

Os valores médios dos rendimentos obtidos pelos equipamentos testados, comparando-os ao experimento em condições padrão, observa-se que o modelo Clevenger denotou distanciamento de 0,473 % do padrão, enquanto o modelo Farmacopeico denotou apenas 0,359 %.

As quantificações obtidas com extrações de 3 horas com equipamento Farmacopeico superou os valores obtidos com Clevenger, mas se apresentaram inferiores a metodologia padrão que apresentou cerca de 1,23 % de OE.

Os valores obtidos em todos os experimentos com 3 h de extração se mostraram inferiores ao teórico de 1,3 % especificado por BARTHHAAS (2020). Entretanto, experimentos realizados por Rodolfi *et al* (2019) também apontaram três diferentes cultivares com teores abaixo de 1,0 %, caracterizados como Cascade.

Após a obtenção dos dados de rendimento do OE do cultivar Cascade, observou-se certa dificuldade na quantificação, devido à baixíssima quantidade de OE resultante, para as demais cultivares optou-se então por um planejamento experimental mais abrangente, com objetivo de validar a quantidade de 20 g de lúpulo e um tempo de extração de 2 h.

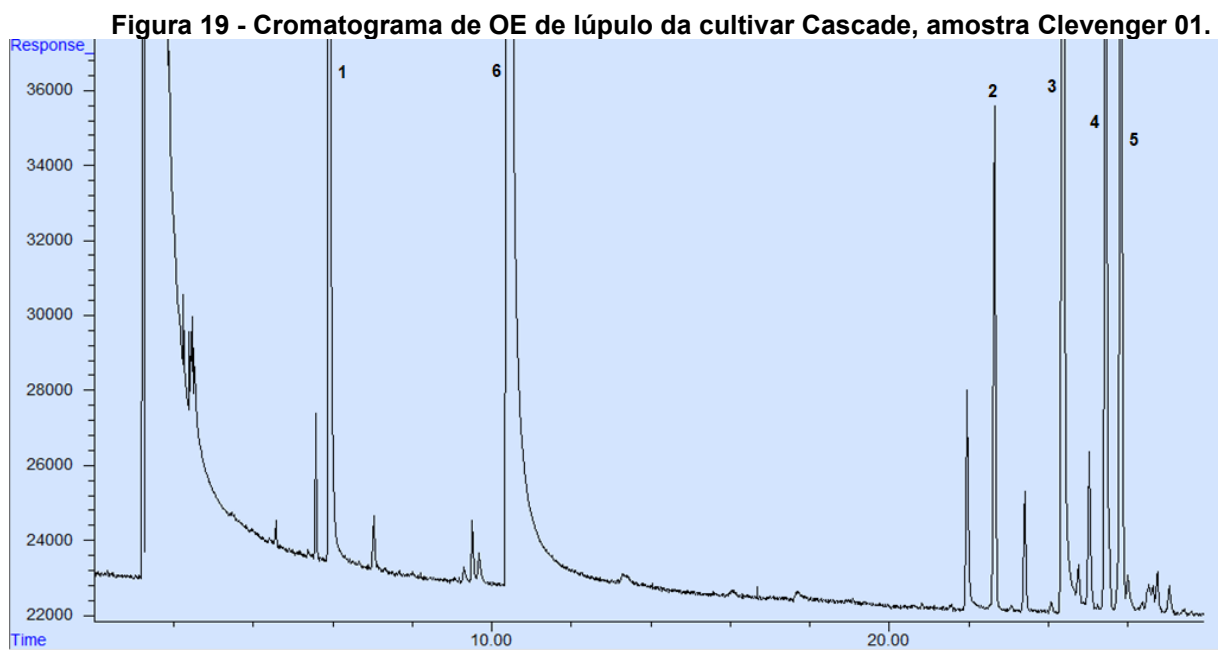
#### 4.1.2 Quantificação e Identificação dos compostos do OE de lúpulo

A quantificação e identificação dos compostos presentes no OE de lúpulo da cultivar Cascade foram baseadas na metodologia proposta por Bizzo, *et al* (2020), através de planilhas eletrônicas que processam o cálculo do índice de retenção (IR) comparando os tempos de retenção dos padrões de n-alcenos (C<sub>9</sub>-C<sub>26</sub>) com os fragmentos originados pelos espectros de massas, estes índices foram então comparados com os valores definidos por Adams (2017).

Essa análise foi realizada apenas para esse cultivar como base de informação para o prosseguimento da extração do óleo essencial dos diferentes cultivares de

lúpulo produzidos em São Paulo/Brasil em quantidades de plantas e o tempo de extração diferentes do indicado na metodologia padrão.

O cromatograma originado pelo CG/FID fornece o tempo de retenção (Tr) e a área formada pelos picos dos principais compostos que formam o OE de lúpulo. Na Figura 19, tem-se como exemplo a representação do cromatograma da amostra Clevenger 01, obtida com 10 gramas de amostra extraída por 3 horas, indicando os 5 principais compostos, seguidos do pico 6 originado pelo padrão interno octanoato de metila com Tr de 10,44 minutos.



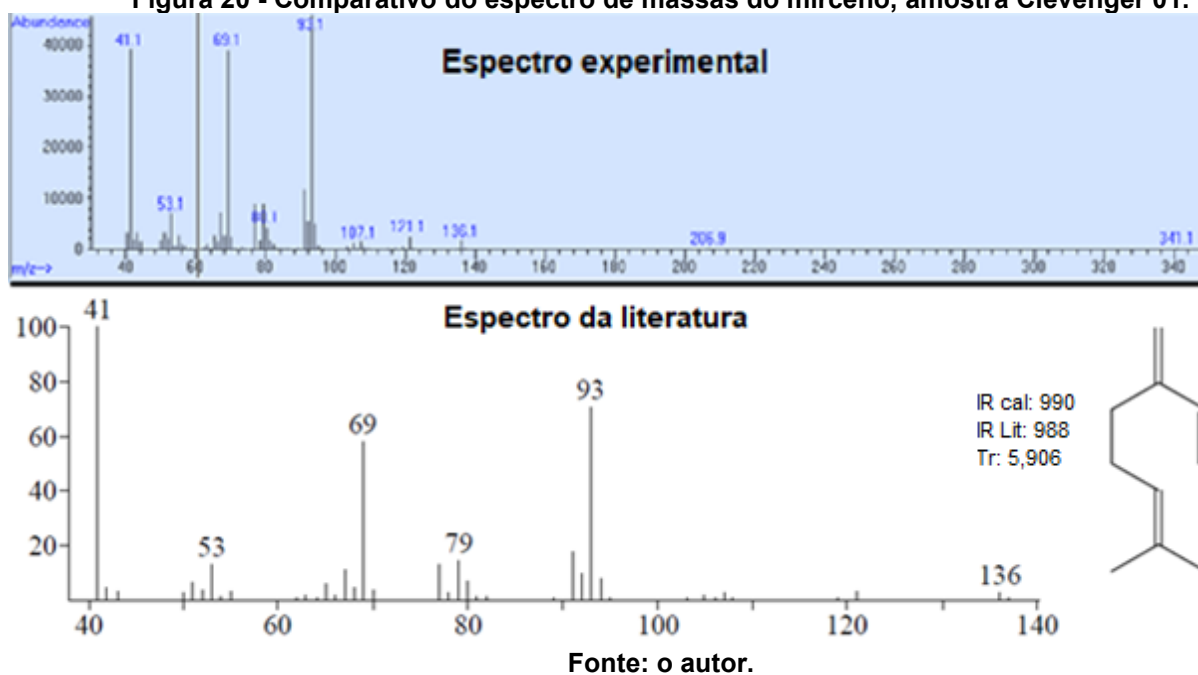
Fonte: o autor.

Os demais cromatogramas das demais amostras de Cascade analisadas encontram-se no Anexo B deste trabalho.

Com os espectros de massas obtidos para cada composto evidenciado pelos picos mencionados anteriormente, nos respectivos cromatogramas de cada amostra analisada, foi possível identificar e afirmar quais compostos foram encontrados.

Na Figura 20, evidencia-se o espectro de massa do mirceno encontrado no pico 1 do cromatograma da amostra Clevenger 01 (Figura 19). Esta afirmação é dada comparando-se o IR calculado de 990 com o IR da literatura de 988, assim como a característica do espectro de massa obtido, com o espectro apresentado por Adams (2017).

Figura 20 - Comparativo do espectro de massas do mirceno, amostra Clevenger 01.



Os demais espectros gerados para os outros compostos encontrados nas amostras encontram-se no Anexo B deste trabalho.

Com base nos dados obtidos, tanto dos cromatogramas, quanto dos espectros, foi possível gerar a Tabela 12, na qual se apresenta as porcentagens de cada composto quantificado em uma determinada amostra da cultivar Cascade, dadas pela porcentagem de área do pico calculada.

Tabela 12 - Composição química do OE de Cascade da amostra Clevenger 01

Pico	Composto	<sup>1</sup> Tr	<sup>2</sup> IRLcalc	<sup>3</sup> IRLit	Área (%)
1	mirceno	5,9	990	988	46,1
2	E-cariofileno	22,6	1412	1417	5,4
3	(E)-beta-farneseno	24,4	1453	1454	25,3
4	beta-selineno	25,4	1479	1489	11,2
5	alfa-selineno	25,8	1488	1498	12,0

<sup>1</sup>Tr: Tempo de retenção, <sup>2</sup>IRLcalc: Índice de retenção calculado, <sup>3</sup>IRLit: Índice de retenção da literatura.

Fonte: o autor.

Relacionando-se os principais compostos encontrados nas 9 amostras da cultivar Cascade analisada foi possível gerar a Tabela 13.

**Tabela 13 - Comparativo das composições químicas das amostras de Cascade.**

<b>Amostras:</b>	<b>Padrão</b>	<b>C - 01</b>	<b>C - 02</b>	<b>C - 03</b>	<b>C - 04</b>	<b>F - 01</b>	<b>F - 02</b>	<b>F - 03</b>	<b>F - 04</b>
TE (horas)	4	3	3	3	4	3	3	3	4
ML (gramas)	100	10	10	10	10	10	10	10	10
% mirceno	7,22	46,14	37,24	38,98	6,02	40,98	42,63	15,19	17,21
% (E)- $\beta$ -farneseno	37,98	25,29	28,91	27,87	40,69	15,94	25,84	10,14	37,48
% (E)-cariofileno	7,55	5,36	6,04	5,97	7,85	NI	5,77	NI	7,98
% $\beta$ -selineno	17,63	11,17	13,35	13,04	18,16	9,93	12,38	4,85	17,87
% $\alpha$ -selineno	19,16	12,03	14,45	14,15	19,68	10,86	13,37	5,17	19,47
% selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	2,70	NI	NI	NI	2,46	NI	NI	NI	NI
% 7-epi- $\alpha$ -selineno	0,58	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
% tetradecano	NI	NI	NI	NI	NI	22,28	NI	64,65	NI
% $\alpha$ -trans-bergamoteno	1,95	NI	NI	NI	2,08	NI	NI	NI	NI
% $\beta$ -chamigrano	2,97	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

**NI: Não Identificado, C: Clevenger, F: Farmacopeico, TE: Tempo de Extração, ML: Massa de Lúpulo.**

**Fonte: o autor.**

Analisando os principais compostos dos OE, denota-se altos teores de mirceno nas amostras com extrações de 3 h, valores muito altos em comparação ao padrão de 4 h. O mirceno pode ser considerado um dos compostos majoritários no OE de lúpulo, entretanto baixos valores podem ser encontrados em cultivares Cascade como os dados revelados por Almeida *et al* (2020). Baixos teores de mirceno ainda podem ser justificados pela maturidade da planta, como menciona Sharp, Townsend, Qian e Shellhammer (2014).

Fica evidente através da análise crítica das concentrações de mirceno, que o processo de extração do OE com tempos elevados pode ocasionar um decréscimo na capacidade de recuperação do mirceno da amostra, ou ocasionar uma possível degradação térmica do mirceno.

Os valores de cariofileno para todas as amostras analisadas apresentaram-se próximos aos valores encontrados por Almeida *et al* (2020), em seus estudos com Cascade de origem brasileira. Por outro lado, apresentaram-se com o dobro dos valores encontrados por Iglesias *et al* (2020), em seus cultivares argentinos.

Os teores de farneseno encontrados em todas as amostras apresentaram-se muito superiores aos teores apresentados por estudos como os de Almeida *et al* (2020), Iglesias *et al* (2020) e Forteschi *et al* (2019).

Entende-se que a variabilidade das substâncias citadas, em comparação aos padrões literários, pode estar diretamente ligada com a variabilidade de cultivo, ou seja, tipo de solo, condições climáticas, tempo de exposição solar, dentre outros fatores. Outro fator muito importante se dá ao processo de secagem, que pode ter influenciado diretamente na variabilidade das substâncias encontradas.

Estas variações nas concentrações das substâncias impactam diretamente nas características sensoriais do lúpulo, e conseqüentemente impacto em sua utilização na produção de cerveja.

Por fim, é possível denotar através da análise crítica de todos os compostos relacionados, comparando-se os tempos de extração, que há variabilidade significativa entre os dados de 4 e 3 h de extração, sendo necessários novos experimentos para devida validação.

## **4.2 Otimização da Metodologia de Extração do OE de lúpulo**

Após a obtenção dos resultados originados nos experimentos preliminares, conduziu-se os experimentos de otimização do método de quantificação, aplicados as 5 outras cultivares: Centennial, Comet, Columbus, H-Mitt e Chinook. Antecedendo os processos de extração realizou-se as avaliações de análise microscópica e de teor de umidade das amostras conforme apresentados a seguir.

### **4.2.1 Microscopia dos cones de lúpulo**

Inicialmente, avaliou-se as condições morfológicas das amostras vegetais, com intuito de pré definir, explicar e diferenciar possíveis variações dos resultados obtidos posteriormente.

Ha décadas a utilização de equipamentos geradores de imagens microscópicas é realizada em avaliações de qualidade. Entretanto, ocorrem novos avanços destas técnicas com grande frequência e, com isto, o uso destes equipamentos propicia maior agilidade no controle de qualidade, principalmente no quesito de avaliação anatômica e estrutural de plantas, como expressa o trabalho realizado por Lemp (2007).

A análise microscópica utilizando-se um aumento das objetivas em 1 e 2 vezes (1X e 2X) foi realizada com o intuito de verificar as condições estruturais física dos cones das cultivares Chinook, Centenial, Columbus, H-mitt e Comet, monitorando possíveis destruições estruturais destes cones, causadas pela manipulação excessiva do fornecedor, por exemplo.

É possível visualizar na Imagem 10, assim como nas demais contidas no Apêndice A, pequenas esferas desformes amareladas sobre as folhas e até mesmo sobre o fundo escuro, estas esferas são como microgotículas ou grânulos, ou seja, aglomerados carregados com metabólitos secundários originadas pela glândula de lupulina, assim como visualizado anteriormente pelas Imagens 02 e 03, estas estruturas morfológicas também foram avaliadas em estudos conduzidos por Kupski (2015) e Almeida (2019).

**Imagem 10 - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 2X - cultivar COMET**



**Fonte: O autor.**

Foi possível identificar uma menor quantidade de grânulos de lupulina nas folhas das amostras Columbus, H-Mitt e Chinook, com relação as amostras Centenial e Comet. Esta diferença nas quantidades de grânulos divergente dentre as amostras pode estar ligada a pré manipulação realizada pelo fornecedor, como por exemplo o processo de secagem, tal divergência pode estar diretamente ligada com as quantidades de OE obtidas nos testes apresentados a seguir.

Através do uso de lentes de maiores aproximações, não foi possível identificar quantidades de rompimentos das estruturas de superfície das folhas, que apresentassem significativo impacto no rendimento e de qualidade do OE obtido.

#### 4.2.2 Umidade das amostras de lúpulo

O monitoramento de umidade das amostras foi realizado com o intuito de prever a extensão da intensidade do processo de secagem da matéria vegetal, visto que este processo foi realizado pelo fornecedor, correlacionado assim com possíveis interferências no rendimento de OE, bem como uma possível degradação térmica.

Assim, como afirmam Ghion, Pinto e Schmidt (2020) e Reis *et al* (2006), essa condição expressa a influência negativa sobre o rendimento, composição e a qualidade das plantas que passaram por processo de secagem. O teor de umidade encontrado nas amostras se faz necessário também para a correlação do rendimento de OE encontrado em cada teste, pois a massa de água presente na amostra está diretamente ligada ao teor de OE obtido.

Os valores de umidade obtidos foram subtraídos nos cálculos de rendimento, obtendo-se a concentração de OE por base seca de matéria vegetal. Na Tabela 14, pode-se visualizar um comparativo dentre as diferentes metodologias de determinação de umidade analisadas neste trabalho: método usando balança de infravermelho, método usando estufa até massa constante, e método utilizando a destilação azeotrópica.

**Tabela 14 - Umidade das amostras de Lúpulo em três metodologias.**

	<b>METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE UMIDADE</b>				
	<b>Infravermelho</b>		<b>Estufa</b>		<b>% por Destilação Azeotrópica</b>
	<b>% Média</b>	<b>C.V.</b>	<b>% Média</b>	<b>C.V.</b>	
<b>COMET</b>	13,14	7,17	12,76	3,72	12,50
<b>CENTENIAL</b>	8,68	4,00	9,10	4,12	8,88
<b>COLUMBUS</b>	6,86	4,78	6,92	5,10	7,20
<b>H-MITT</b>	10,13	3,23	9,83	3,86	10,46
<b>CHINOOK</b>	7,93	2,13	8,21	2,78	7,95
<b>CASCADE</b>	--	--	--	--	12,00

**Fonte: O autor.**



A cultivar Cascade, utilizada somente para os testes prévios, foi monitorada somente com a metodologia por destilação azeotrópica.

Devido à restrição da quantidade de amostra disponível para os experimentos, optou-se por não realizar a metodologia por destilação azeotrópica em triplicata, entretanto as avaliações e comparações realizadas denotam uma baixa variabilidade dentre as diferentes metodologias, confirmando confiabilidade ao método infravermelho com relação aos métodos padrões.

Foi possível visualizar uma variação máxima de 0,64 % de umidade, comparando-se o método infravermelho com relação ao método de destilação azeotrópica, isso representa menos de um por cento de erro dentre os métodos utilizados apesar de apresentar um C.V. de 7,17 %.

Devido à grande variabilidade dos teores de umidade encontrados nas amostras analisadas, não é possível classificar adequadamente a qualidade dos cultivares estudados quanto aos aspectos de rendimento de óleo essencial, devido ao processamento de secagem feito pelo fornecedor, a qual impacta diretamente no estudo.

Esta variante não controlada pode estar diretamente ligada à possíveis variações na composição dos OEs estudados como relatadas pelas afirmações de Reis *et al* (2006) em seus estudos espectrométricos.

#### 4.2.3 Otimização da Metodologia de Extração do OE de lúpulo

Os demais experimentos de extração conduzidos com as outras 5 cultivares do estudo foram realizados conforme o planejamento citado na seção 3.4. Os experimentos e a quantidade de OE obtido através da extração com aparelho Clevenger estão relacionados na Tabela 15 a seguir.

**Tabela 15 - Rendimento do Óleo Essencial (OE) de Lúpulo em Base Seca (BS) – equipamento Clevenger.**

(continua)

<b>Experimento</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Massa (g)</b>	<b>Tempo (h)</b>	<b>OE (g)</b>	<b>% de OE (BS)</b>
1	Comet	10,016	1	0,085	0,978
2	Comet	10,012	3	0,069	0,795
3	Comet	20,007	1	0,165	0,943
4	Comet	20,020	3	0,196	1,110
5	Columbus	10,028	1	0,098	1,060

**Tabela 15 - Rendimento do Óleo Essencial (OE) de Lúpulo em Base Seca (BS) – equipamento Clevenger.**

					(conclusão)
Experimento	Cultivar	Massa (g)	Tempo (h)	OE (g)	% de OE (BS)
6	Columbus	10,015	3	0,130	1,390
7	Columbus	20,044	1	0,173	0,929
8	Columbus	20,030	3	0,108	0,580
9	Centenial	10,010	1	0,314	3,414
10	Centenial	10,029	3	0,285	3,118
11	Centenial	20,061	1	0,436	2,381
12	Centenial	20,058	3	0,431	2,359
13	H-Mitt	10,002	1	0,111	1,240
14	H-Mitt	10,002	3	0,123	1,373
15	H-Mitt	20,015	1	0,200	1,115
16	H-Mitt	20,020	3	0,228	1,264
17	Chinook	10,001	1	0,156	1,696
18	Chinook	10,000	3	0,193	2,092
19	Chinook	20,141	1	0,324	1,750
20	Chinook	20,000	3	0,416	2,256

**Fonte: O autor.**

As concentrações de OE obtidas para as cultivares Comet e Columbus se apresentaram abaixo da especificação teórica informada pela BARTHHAAS (2020). Por outro lado, as cultivares Centenial, H-mitt e Chinook denotaram valores próximos ou acima dos índices informados pela BARTHHAAS (2020).

A partir destes resultados acima citados foi possível traçar uma análise estatística ANOVA (análise de variância) para os resultados obtidos no planejamento (Figuras 10) com 98,5 % de limite de confiança para o método Clevenger, ou seja, com um valor  $R^2$  de 98,5 % para o método estudado significa que apenas 1,5 % da variabilidade não é explicada pelo modelo. A pequena diferença de 4,07 % entre o  $R^2$  e o  $R^2$  ajustado implica que se tem menos chance de termos não significativos serem incluídos no modelo. Estes resultados denotam que o modelo de regressão é estatisticamente significativo e confiável para prever o rendimento de OE dentro da gama de fatores estudados.

**Figura 10 - Análise estatística ANOVA – equipamento Clevenger.**

<b>Informações dos Fatores</b>					
Fator	Níveis	Valores			
Variedade	5	Centenial; Chinook; Columbus; Comet; H-Mitt			
Massa	2	10; 20			
Tempo	2	1; 3			

<b>Análise de Variância</b>					
Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	11,3774	0,81267	24,21	0,001
Linear	6	10,3986	1,73311	51,63	0,000
Variedade	4	10,0596	2,51490	74,92	0,000
Massa	1	0,3046	0,30458	9,07	0,030
Tempo	1	0,0345	0,03446	1,03	0,357
Interações de 2 fatores	8	0,9787	0,12234	3,64	0,085
Variedade*Massa	4	0,7650	0,19125	5,70	0,042
Variedade*Tempo	4	0,2137	0,05343	1,59	0,308
Erro	5	0,1678	0,03357		
Total	19	11,5452			

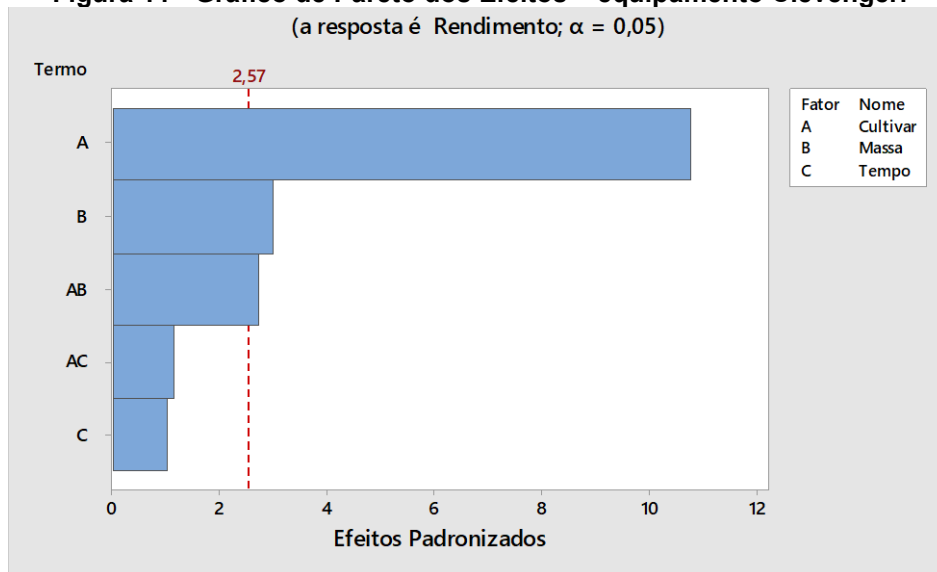
  

<b>Sumário do Modelo</b>				
S	R2	R2(aj)	R2(pred)	
0,183220	98,55%	94,48%	76,74%	

Fonte: O autor.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar na Figura 11, que as variáveis Cultivar (A) e Massa (B) bem como sua interação conjunta (AB), apresentam impacto significativo sobre os teores de OE realizados com o equipamento Clevenger. Observa-se também que o efeito de menor significância é o fator tempo, onde apresenta-se com linearidade sobre sua interação.

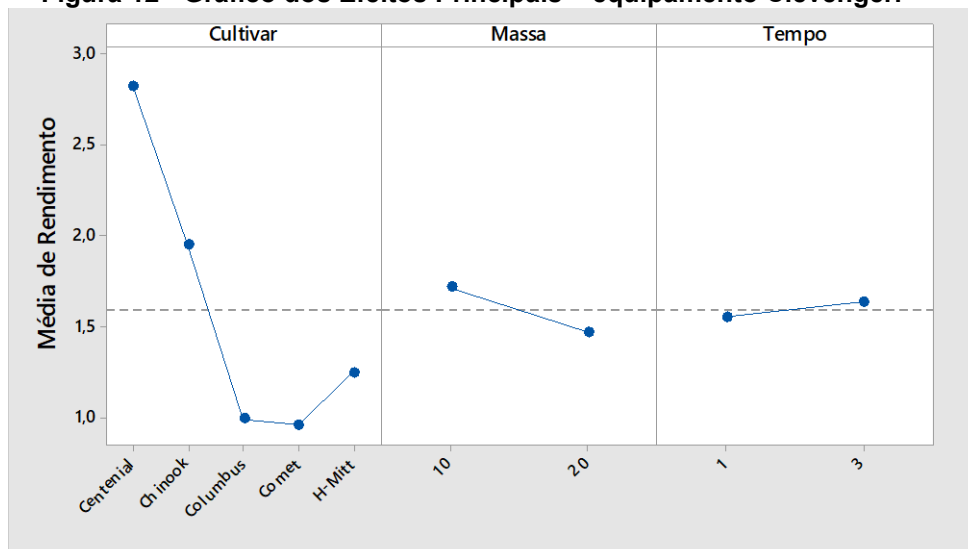
**Figura 11 - Gráfico de Pareto dos Efeitos – equipamento Clevenger.**  
(a resposta é Rendimento;  $\alpha = 0,05$ )



Fonte: O autor.

A Figura 12 mostra os gráficos dos efeitos principais dos fatores tempo, massa e cultivar sobre o rendimento da extração de OE.

**Figura 12 - Gráfico dos Efeitos Principais – equipamento Clevenger.**



Fonte: O autor.

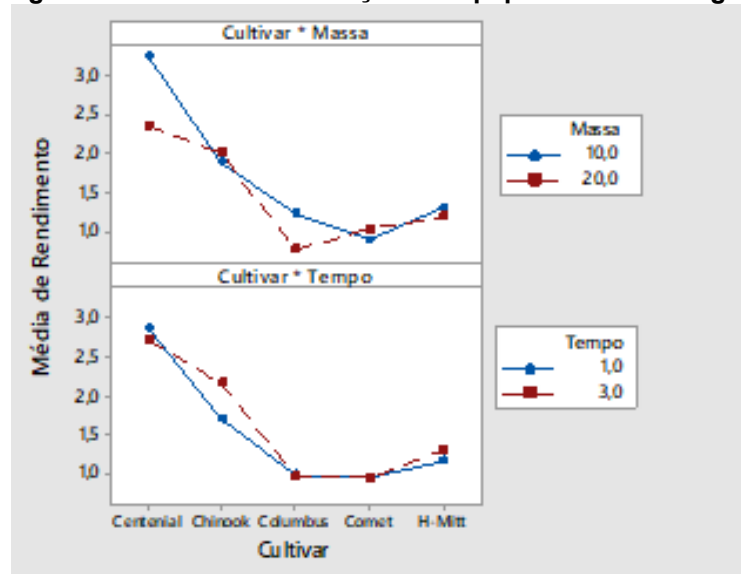
O efeito de um fator é a mudança da resposta produzida pela mudança do nível de um determinado fator. Deste modo, a inclinação nas linhas de efeito mostra quão sensível é o rendimento de OE alterando-se o nível do fator (BALASUNDARAM, SHARMA; 2015).

Visualizou-se que o impacto da mudança de massa de matéria vegetal é conduzido ao decréscimo de rendimento quando se altera do nível -1 para 1, ou seja,

o aumento da quantidade de massa da amostra mostrou uma menor rentabilidade do processo. Este fato pode ser explicado pela diminuição da área de contato da planta com a água, visto que um aumento na carga vegetal dentro do recipiente faz com que gere um aglomerado de planta, perdendo a eficiência de extração que a água é capaz de promover.

Já na Figura 13, observa-se que os gráficos de Interações mostram que o efeito de um fator causado sobre o rendimento pode ser dependente do nível de outro fator.

**Figura 13 - Gráfico de Interações – equipamento Clevenger.**



Fonte: O autor.

É possível visualizar uma alta tendência de paralelismo entre as linhas de interação dos fatores cultivar e tempo, indicando que a interação entre os dois fatores é fraca, seguindo as indicações propostas pelas análises de Balasundaram e Sharma (2015). Já a ausência de paralelismo entre os fatores cultivar e massa indica uma alta interação no efeito sobre o rendimento, o gráfico de interações revela que o efeito da Cultivar sobre o rendimento será mais forte se o fator Massa for mantido em níveis superiores.

Como previsto, a variável de maior impacto se apresentou como sendo as diferentes cultivares de lúpulo, pois cada variedade possui características diferentes, ou seja, algumas consideradas lúpulos de aroma, possuem altos teores de OE e baixos teores de  $\alpha$  e  $\beta$  ácidos, impactando diretamente no rendimento.

Para verificar profundamente o impacto estatístico das variáveis de interesse avaliadas através do equipamento Clevenger, foi proposto o planejamento modificado

para o equipamento Farmacopeico, os resultados obtidos estão expressos na Tabela 16.

**Tabela 16 - Rendimento de Óleo Essencial (OE) de Lúpulo em Base Seca (BS) – equipamento Farmacopeico.**

Experimento	Cultivar	Massa (g)	Tempo (h)	OE (g)	% de OE (BS)
1	Comet	7,077	2	0,085	1,391
2	Comet	15,018	0,43	0,117	0,892
3	Comet	15,033	2	0,216	1,654
4	Comet	7,070	0,43	0,075	1,222
5	Columbus	15,051	2	0,155	1,099
6	Columbus	15,072	0,43	0,166	1,178
7	Columbus	7,076	2	0,062	0,949
8	Columbus	7,070	0,43	0,057	0,870
9	Centenial	15,019	2	0,473	3,432
10	Centenial	7,073	2	0,177	2,735
11	Centenial	15,024	0,43	0,414	3,020
12	Centenial	7,070	0,43	0,163	2,512
13	H-Mitt	15,011	0,43	0,237	1,758
14	H-Mitt	15,002	2	0,268	1,992
15	H-Mitt	7,071	2	0,104	1,637
16	H-Mitt	7,070	0,43	0,093	1,461
17	Chinook	15,003	0,43	0,218	1,580
18	Chinook	15,027	2	0,222	1,604
19	Chinook	7,073	2	0,138	2,107
20	Chinook	7,070	0,43	0,123	1,885

Fonte: O autor.

As concentrações de OE obtidas para a cultivar Columbus se apresentaram abaixo da especificação teórica informada pela BARTHHAAS (2020). Por outro lado, as demais cultivares denotaram valores próximos ou acima dos índices teóricos.

A partir destes resultados acima citados foi possível traçar uma análise estatística ANOVA (análise de variância) para os resultados obtidos no planejamento (Figuras 14) com 98,82 % de limite de confiança para o método Farmacopeico, ou seja, com um valor  $R^2$  de 98,82 % para o método estudado significa que apenas 1,18 % da variabilidade não é explicada pelo modelo, um valor muito baixo, a qual não causa impacto significativo no nível de confiança dos resultados obtidos. A diferença de 3,29 % entre o  $R^2$  e o  $R^2$  ajustado, implica que se tem menos chance de termos não significativos serem incluídos no modelo. Estes resultados denotam que o modelo de regressão é estatisticamente significativo e confiável para prever o rendimento de OE dentro da gama de fatores estudados.

**Figura 14 - Análise estatística ANOVA – equipamento Farmacopeico.**

<b>Informações dos Fatores</b>					
Fator	Níveis	Valores			
Cultivar	5	Centenial; Chinook; Columbus; Comet; H-Mitt			
Massa	2	7,070; 15,000			
Tempo	2	0,43; 2,00			

<b>Análise de Variância</b>					
Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Modelo	14	9,5527	0,68234	29,98	0,001
Linear	6	8,8430	1,47383	64,75	0,000
Cultivar	4	8,4925	2,12313	93,27	0,000
Massa	1	0,1033	0,10334	4,54	0,086
Tempo	1	0,2472	0,24715	10,86	0,022
Interações de 2 fatores	8	0,7097	0,08871	3,90	0,075
Cultivar*Massa	4	0,5817	0,14542	6,39	0,033
Cultivar*Tempo	4	0,1280	0,03201	1,41	0,353
Erro	5	0,1138	0,02276		
Total	19	9,6665			

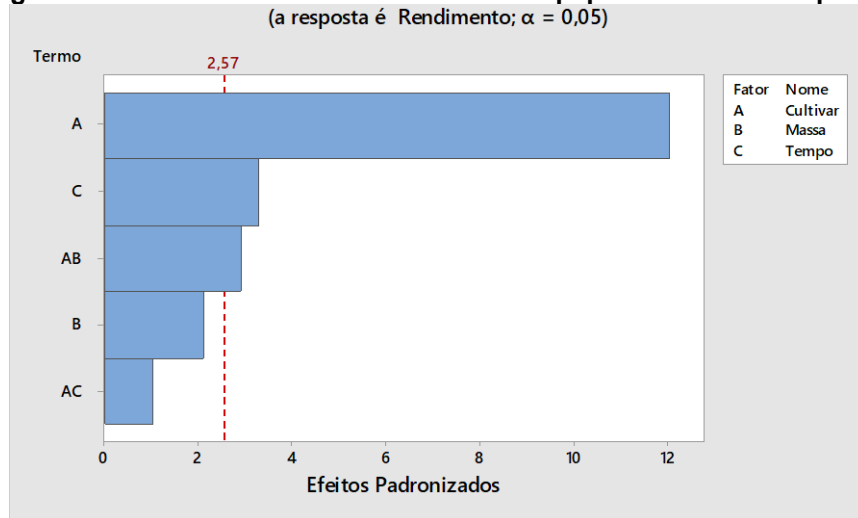
  

<b>Sumário do Modelo</b>			
S	R2	R2(aj)	R2(pred)
0,150874	98,82%	95,53%	81,16%

Fonte: O autor.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se observar, na Figura 15, que as variáveis, cultivar (A) e tempo (C), bem como a interação conjunta (AB) apresentam impacto significativo sobre os teores de OE realizados com o equipamento Farmacopeico. Observa-se também que os efeitos entre a interação AC (Cultivar/Tempo) e Massa (B) não apresentaram significância.

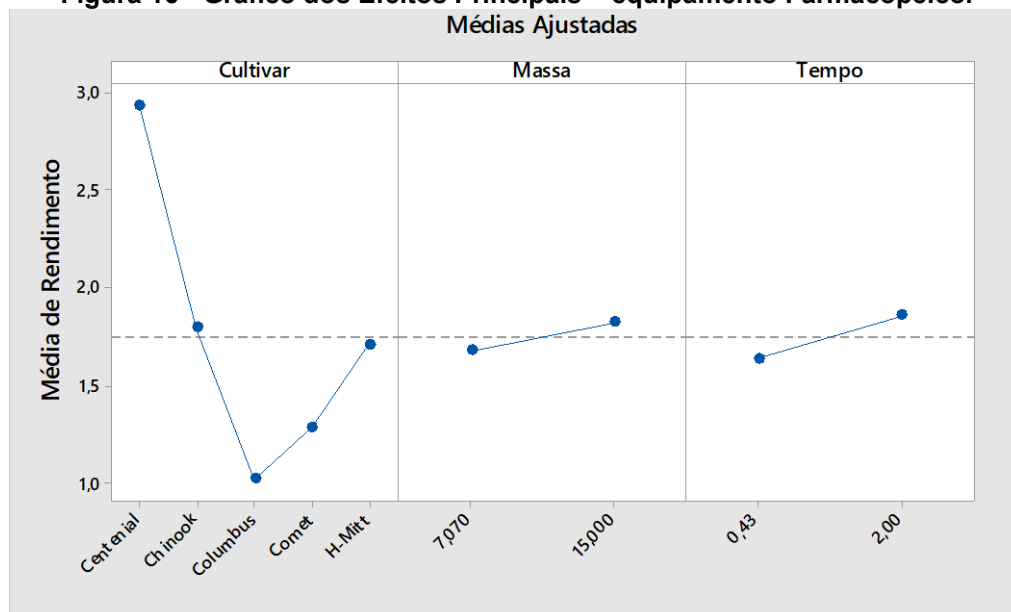
**Figura 15 - Gráfico de Pareto dos Efeitos – equipamento Farmacopeico.**  
(a resposta é Rendimento;  $\alpha = 0,05$ )



Fonte: O autor.

Observa-se, na Figura 16, a partir do gráfico de efeitos principais que o aumento gradativo dos fatores massa e tempo causam um acréscimo na variável rendimento, confirmando o apontamento obtido no experimento com equipamento Clevenger.

**Figura 16 - Gráfico dos Efeitos Principais – equipamento Farmacopeico.**  
Médias Ajustadas

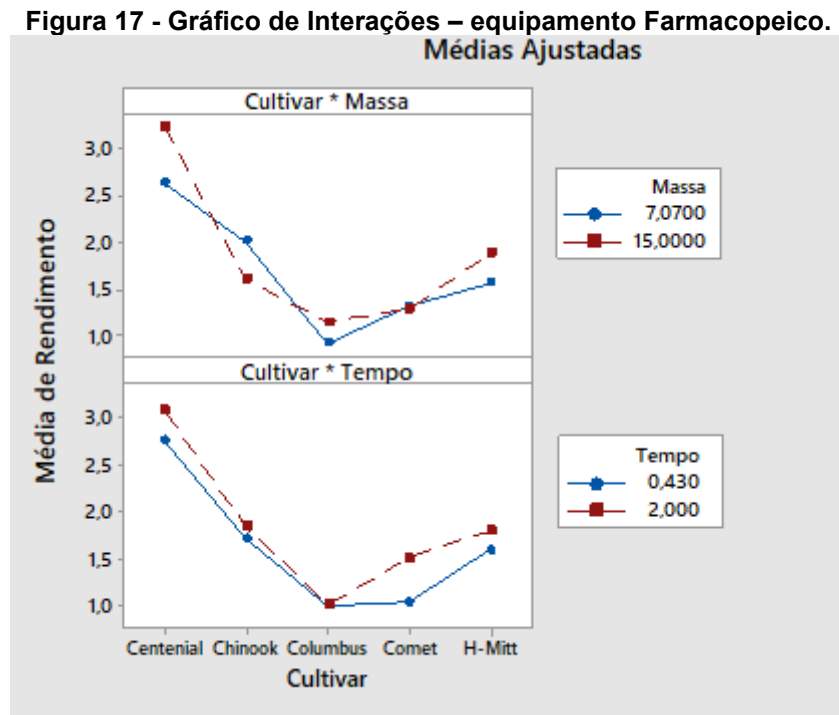


Fonte: O autor.

Já na Figura 17, observa-se os gráficos de interações para os experimentos com equipamento Farmacopeico. Visualiza-se nestes gráficos, assim como nos resultados obtidos para o equipamento Clevenger, uma alta tendência de paralelismo entre as linhas de interação dos fatores Cultivar e Tempo, indicando que a interação entre os dois fatores é fraca, seguindo as indicações propostas pelas análises de



Balasundaram e Sharma (2015). Já a ausência de paralelismo entre os fatores Cultivar e Massa, indica uma alta interação no efeito sobre o rendimento, o gráfico de interações revela que o efeito da Cultivar sobre o rendimento será mais forte se o fator Massa for mantido em níveis superiores.



Fonte: O autor.

Como previsto, a variável de maior impacto se apresentou como sendo as diferentes cultivares de lúpulo, pois cada cultivar possui características diferentes, ou seja, algumas consideradas lúpulos de aroma, possuem altos teores de OE e baixos teores de  $\alpha$  e  $\beta$  ácidos, impactando diretamente no rendimento.

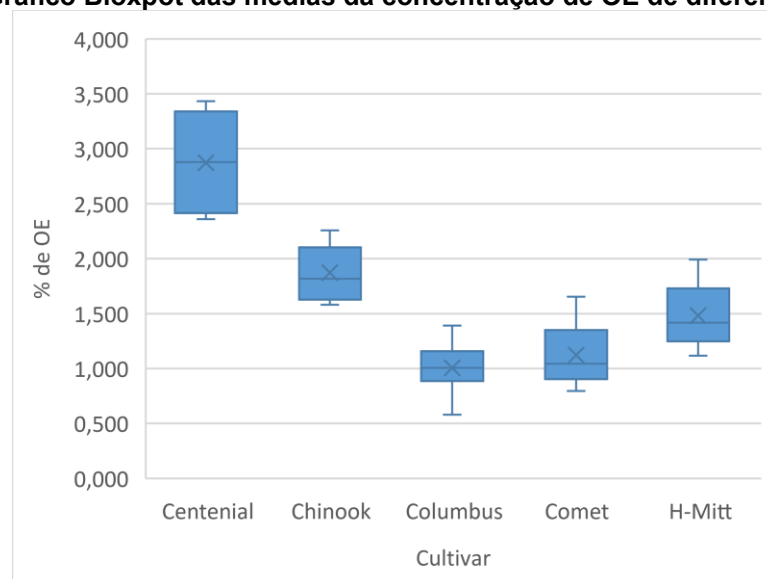
Outro fator importante a ser mencionado é a característica física da matéria vegetal analisada, visto que inúmeros trabalhos utilizados como comparativo fazem uso de lúpulo em sua forma peletizada, não mencionando esta importante informação. O lúpulo em formato de pelete passou por um processamento de moagem, compactação e até mesmo de perda de água, este processo pode acarretar em variações na concentração de OE por massa (g) de material, em comparação a matéria vegetal íntegra com sua forma de cone intacta (EYRES, DUFOUR; 2009).

Outro ponto importante que Eyres e Dufour (2009) mencionam, e que se torna aplicável ao estudo, é o fato de que os lúpulos íntegros armazenados por um período superior a 6 meses em temperaturas acima de 20 °C são mais suscetíveis a uma

perda de 50 a 70% de OE, assim como uma possível degradação oxidativa dos compostos presentes, fato a qual pode ter ocorrido no produto em um período anterior ao recebimento da amostra para estudo.

A seguir foram relacionados todos os resultados de concentração de OE das diferentes cultivares. Os valores expressos no gráfico *bloxpot*, conforme Figura 18, contemplam as concentrações para todos os experimentos realizados, nas diferentes massas de planta, nos diferentes tempos de extração e também nos diferentes equipamentos estudados.

**Figura 18 - Gráfico Bloxpot das médias da concentração de OE de diferentes cultivares.**



**Fonte: O autor.**

As concentrações de OE obtidas para as cultivares Centenial e H-Mitt, com ambos os equipamentos, se mostraram acima dos valores teóricos e 1,5 a 2,5 % para a Centenial e 0,5 a 1,0 % para a H-mitt conforme informa a BARTHHAAS (2020). Por outro lado, as cultivares Columbus e Comet se mostraram abaixo dos valores teóricos esperados, 2,5 a 3,5 % para a Columbus e 1,4 a 3,3 % para a Comet. Apesar dos valores teóricos, a Columbus e a Comet são considerados lúpulos de amargor juntamente com a cultivar Chinook, ou seja, são plantas com características naturais e tendência de baixos teores de OE. As demais cultivares são consideradas lúpulos de aroma, com maiores teores de OE.

Durante os processamentos de extração de óleo essencial do diferentes cultivares do lúpulo, foi possível identificar uma sugestão de melhoria estrutural do equipamento Farmacopeico utilizado. O aparelho disponível apresenta-se com uma

escala de graduação entre 0 e 3 mL, se esta estrutura graduada compreendida pelo segmento JL da Figura 06 possuísse uma escala de graduação somente de 0 a 1 mL, com menor espessura, com o mesmo comprimento dimensional e possuindo intervalos de leitura de 0,01 mL, se enquadrariam maiores precisões na quantificação dos OE obtidos nas amostras aplicadas a metodologia reduzida proposta por este estudo.

#### 4.2.4 Índice de Refração do OE de Lúpulo

O índice de refração é obtido pela razão do seno do ângulo de incidência de um raio de luz deslocado pelo ar e o seno do ângulo de refração no líquido. Este índice indica quanto o feixe de luz, ao passar pela amostra, é modificado em relação a sua velocidade de propagação, sendo, portanto, característico para cada tipo de óleo (SHRINER et al., 1983). Assim, devido a diferentes composições possíveis dos OE, o índice de refração se alterará, pois a presença ou ausência destes compostos irão interferir na propagação da luz, alterando assim o índice analisado (MORAES, 2012).

A análise do índice de refração, ou quaisquer outras análises refratométrica, poderá indicar ou elucidar de forma técnica e quantitativa uma avaliação da qualidade do OE quanto a sua concentração, turbidez e até mesmo coloração.

O índice de refração foi medido em triplicata para cada uma das 5 cultivares estudadas no planejamento fatorial, ambas a uma temperatura de 26 °C. Os valores obtidos de  $n_D$ , aos quais podem ser visualizados na Tabela 17, denotaram uma variação média de 1,4690 a 1,4823, respectivamente.

**Tabela 17 - Índice de Refração – Óleo Essencial (OE) de diferentes cultivares de Lúpulo.**

	COMET	CENTENIAL	COLUMBUS	H-MITT	CHINOOK
Exp.	$n_D$	$n_D$	$n_D$	$n_D$	$n_D$
1°	1,472	1,4825	1,471	1,476	1,4825
2°	1,4715	1,482	1,471	1,476	1,4825
3°	1,472	1,4825	1,4715	1,455	1,482
<b>Média</b>	1,4718	1,4823	1,4712	1,469	1,4823
<b>C.V.</b>	0,0196	0,0195	0,0196	0,8253	0,0195

Fonte: O autor.

Os experimentos demonstraram um C.V. máximo de 0,8253, denotando uma baixa variabilidade entre os dados, conseqüentemente maior confiabilidade

experimental dos valores obtidos. O método e o equipamento utilizado possuem uma precisão experimental de  $\pm 0,0002$  para os valores de  $n_D$ .

Comparando a ficha técnica do OE de lúpulo disponível na Farmacopeia Europeia (2002) com os valores obtidos experimentalmente, é possível denotar que os resultados se apresentam dentro da faixa de 1,470 até 1,476  $n_D$  conforme o padrão. Esse parâmetro é importante de ser avaliado visto que produtos sintéticos ou adulterados possuem índices de refração distintos, ou seja, através dele é possível comprovar a pureza do óleo essencial.

#### 4.2.5 Densidade Relativa do OE de lúpulo

A avaliação da densidade dos OEs é uma forma clara de qualificar este produto, com estes valores é possível indicar a tendência de viscosidade e aspecto físico do OE, ressaltando que estes produtos são compostos voláteis, ou seja, possuem baixa densidade em comparação à água. A obtenção de valores diferenciados mostrará possíveis problemas ou alterações no processo de extração, desqualificando o produto como um OE.

Através da calibração da micropipeta utilizando água destilada como substância padrão, foi possível denotar um C.V. de 3,30% e um erro médio de medição de  $\pm 0,0088$  em relação ao valor teórico, este erro representa o somatório das variações de medição, sendo elas a variação padrão dos equipamentos, como pipeta e balança, e a expertise do analista. Para a calibração foram feitas 5 repetições em 3 volumes diferentes (10 $\mu$ L, 5 $\mu$ L e 2 $\mu$ L), totalizando 15 repetições.

As avaliações feitas nas amostras analisadas utilizaram o volume de 5 $\mu$ L de OE e as densidades absolutas e relativas estão dispostas na Tabela 18 por suas médias, seguidas do C.V. encontrado para as medições.

**Tabela 18 - Densidade Relativa ( $D_{20}^{20}$ ) – OE de diferentes cultivares de Lúpulo.**

	COMET	CENTENIAL	COLUMBUS	H-MITT	CHINOOK
<b><math>D_{20}^{20}</math> Média</b>	0,789	0,809	0,756	0,836	0,783
<b>C.V.</b>	5,292	2,863	1,533	2,771	2,564

Fonte: O autor.

Todas as medições citadas foram realizadas a uma temperatura ambiente de 26 °C, e os valores encontrados nos experimentos apresentam-se muito próximos aos valores evidenciados por outros estudos, bem como os valores de 0,750 a 0,800, citados pela Farmacopeia Europeia (2002).

## 5 ETAPAS POSTERIORES E RESULTADOS ESPERADOS

Para as próximas etapas deste estudo se faz necessária a realização de replicatas das metodologias propostas, aumentando a confiabilidade das avaliações estatísticas dos resultados obtidos, bem como possibilitando uma melhoria na avaliação dos efeitos dos fatores estudados. A ampliação do número de extrações, possibilitará traçar uma superfície de resposta capaz de prever as melhores condições para obter maior rendimento de OE utilizando os equipamentos citados no estudo.

Outro fator importante a ser levado em conta nas próximas etapas é a aplicação destes experimentos em amostras com características físicas diferentes, como lúpulos peletizados, possibilitando a aplicação da metodologia em diferentes lúpulos encontrados comercialmente.

Um outro impacto a ser levado em consideração nas próximas etapas e em estudos posteriores é a influência do processamento de secagem, visto que as amostras foram obtidas já tratadas no fornecedor. A utilização de amostras *in natura* com posterior processamento de secagem controlada possibilitará uma maior padronização e avaliação das metodologias propostas.

A análise de CG-MS para caracterização das substâncias presentes no OE é de vital importância a ser realizada nas próximas etapas do estudo, pois possibilitará uma avaliação quantitativa do impacto causado nas diferenças das metodologias de extração.

Por fim, a inclusão de outras avaliações das características do OE poderá ser usada para possibilitar tanto a validação dos métodos estudados, quanto à qualidade das cultivares brasileiras testadas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho se apresentaram de maneira satisfatória para o desenvolvimento e melhoria das técnicas de extração de OE do lúpulo, assim como as formas de avaliar sua qualidade.

Foi possível identificar as principais influências sobre o rendimento de OE, assim como as características físico-químicas analisadas se apresentaram próximas as literais. A caracterização do OE das diferentes cultivares brasileiras estudadas possibilita uma amplitude do potencial comercial destes insumos, assim como auxilia no conhecimento para o desenvolvimento de técnicas agrícolas voltadas ao cultivo desta planta.

Se torna factível novos experimentos para as metodologias propostas, possibilitando plena aplicação prática do modelo, levando em consideração todos os interferentes apontados neste trabalho.

A validação de uma metodologia de análise do OE por si já é de extrema complexidade, devido à grande variabilidade de influências que percorrem a composição do OE, maturidade da planta, estrutura física da planta, clima, nutrição, tempo de extração, temperatura, etc. Para o OE de lúpulo, além de todos os fatores citados, ainda devemos considerar a enorme variabilidade genética oriunda das diferentes cultivares, que a cada dia se expande com o mercado cervejeiro artesanal.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. London: Allured Pub, Corp., ed. 4.1, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 5785: Óleos essenciais: determinação do índice de refração**, 1985.
- AGROCLIMA. **Projeto irá fomentar cultivo de lúpulo no Brasil**. Disponível em: <<https://agroclima.climatempo.com.br/noticia/2020/10/16/projeto-ira-fomentar-cultivo-de-lupulo-no-brasil-6186>>. Acesso em: fevereiro 2021.
- ALMAGUER, C.; SCHONBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT E. K.; BECKER, T.; **Journal of the Institute of Brewing**. n. 120, p. 289, 2014.
- ALMEIDA, Aline da Rosa. **Caracterização do lúpulo (humulus lupulus L.) Cultivado no Brasil**. 154 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Programa de pós-graduação em ciência dos alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Santa Catarina. 2019.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Gerência Geral de Cosméticos. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos**. Brasília, 2007.
- ASBC. Moisture. In: **ASBC Methods of Analysis**. American Society of Brewing Chemists, 2018. DOI: 10.1094/ASBCMOA-Hops-4. Disponível em: <<http://www.asbcnet.org/moa/summaries/Hops-4>>.
- ASBC. Total essential oil. In: **ASBC Methods of Analysis**. American Society of Brewing Chemists, 2018. DOI: 10.1094/ASBCMOA-Hops-13. Disponível em: <<http://www.asbcnet.org/moa/summaries/Hops-13>>.
- BADR, Nadia BE; AL-QAHTANI, Khairia M.; MAHMOUD, Alaa El Din; Factorial experimental design for optimizing selenium sorption on Cyperus laevigatus biomass and green-synthesized nano-silver. **Alexandria Engineering Journal**. v. 59, ed. 6, p. 5219-5229, 2020.
- BAMFORTH, W. C.; **Beer: tap into the art and science of brewing**, 2nd ed., Oxford University, Press: New York, 2003.
- BAMFORTH, W. C.; **Beer is Proof God Loves Us**, 1st ed., FT Press: Upper Saddle River, 2010.
- BARTHHAAS. Hop Harvest Guide 2019. **Familie Barth**, p. 101, 2020.
- BARTHHAAS. **REPORT Hops 2019/2020**. Disponível em: <[https://www.barthhaas.com/fileadmin/user\\_upload/do](https://www.barthhaas.com/fileadmin/user_upload/do)>. 2020.
- BIZZO, Humberto. R.; Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.



BIZZO, H. R.; BARBOZAB, E. G.; SANTOS, M. C. S.; GAMA, P. E.; Um Conjunto De Planilhas Eletrônicas Para Identificação E Quantificação De Constituintes De Óleos Essenciais. **Química Nova**, v. 43, n. 1, p. 98-105, 2020.

BOCQUET L.; SAHPAZ, S.; HILBERT, J. L.; RAMBAUD C.; RIVIERE, C.; **Phytochemistry**. p. 17, ed. 1047. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução Normativa 65**, de 10 de dezembro de 2019. p. 1–7, 2019.

BURGESS, A. H. **Hops, botany, cultivation and utilization**. New York: Interscience Publishers Inc., 1964.

CATALISI. **Aumento dos campos de lúpulo na última safra junto a queda de demanda por cerveja devido a pandemia leva produtores de lúpulo no mundo para crise**. Disponível em: <<http://catalisi.com.br/mercado-tera-excesso-de-lupulo-pela-primeira-vez-em-sete-anos/>>. Acesso em: fevereiro 2021.

CATALISI. **Mercado terá excesso de lúpulo pela primeira vez em sete anos**. Disponível em: <<https://catalisi.com.br/mercado-tera-excesso-de-lupulo-pela-primeira-vez-em-sete-anos>>. Acesso em: setembro de 2020.

CONSTANTINO, M. G.; SILVA, G. V. J. DA; DONATE, P. M. **Fundamentos de Química Experimental**. 6. ed. São Paulo: Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, 2004.

CHEN, G.; SUN, F.; WANG, S.; WANG, W.; DONG, J.; GAO, F.; Enhanced extraction of essential oil from Cinnamomum cassia bark by ultrasound assisted hydrodistillation. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 2020.

CRONIN; RODRIGUEZ; WESTERFIELD. Microwave Essential Oil Extraction via Alternative Solvent. **OilExTech, School of CBEE**, 2015. Disponível em: <[https://oilextech.com/wp-content/uploads/2015/12/Hop-Oil-and-AltSolv\\_FinalReport1.pdf](https://oilextech.com/wp-content/uploads/2015/12/Hop-Oil-and-AltSolv_FinalReport1.pdf)>. Acesso em: 19 out. 2020.

DENOMA, J. S. **Humulus Genetic Resources. Hop. USDA ARS National Clonal Germplasm Repository, Corvallis, Oregon**. Disponível em: <<https://www.ars-grin.gov/ars/PacWest/Corvallis/ncgr/humulus/huminfo.html>>. Acesso em: 19 out. 2020.

DUKE, J. A. Humulus lupulus L. In: **Handbook of Energy Crops**. 1983.

DURELLO, Renato S.; SILVA, Lucas M.; JUNIOR, Stanislaw B.; Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, n. 8, p. 900-919, 2019.

European Pharmacopeia. 8. Ed, Strasbourg: **Council of Europe**, 2416 p., 2002.

EYRES, G.; DUFOUR, J. P. Hop essential oil: Analysis, chemical composition and odor characteristics. **Beer in Health and Disease Prevention**, p. 239–254, 2009.

FAGHERAZZI, M. M. **Como é a produção de lúpulo na Serra Catarinense?** Disponível em: <<https://www.aprolupulo.com.br/others/entrevista-com-mariana->

mendes-fagherazzi.php>. Acesso em: 12 fev. 2021.

FARAG, M. A.; WESSJOHANN, L. A. Cytotoxic effect of commercial *Humulus lupulus* L. (hop) preparations – In comparison to its metabolomic fingerprint. **JOURNAL OF ADVANCED RESEARCH**, 2012.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4 ed. São Paulo, Atheneu, 1988.

FORTESCHI, M. et al; Quality assessment of Cascade Hop (*Humulus lupulus* L.) grown in Sardinia. **European Food Research and Technology**. n. 245, p. 863-871, 2019.

GLOBO RURAL. **Variedade brasileira de lúpulo é descoberta na Serra da Mantiqueira**. Disponível em: <<http://g1.globo.com/economia/agronegocios/noticia/2016/05/variedade-brasileira-de-lupulo-e-descoberta-na-serra-da-mantiqueira.html>>. Acesso em: setembro 2020.

EYRES, Graham; DUFOUR, Jean-Pierre. Hop Essential Oil: Analysis, Chemical Composition and Odor Characteristics. **Beer in Health and Disease Prevention**. Elsevier. ISBN: 978-0-12-373891-2. p. 239, 2009

HENDERSON, M. C. et al. In vitro inhibition of human P450 enzymes by prenylated avonoids from hops, *Humulus lupulus*. **National Library of Medicine (NLM), PubMed, National Center for Biotechnology Information**, v. 8, p. 235–251, 2000.

IGLESIAS, A. et al; Essential oils from *Humulus lupulus* as novel control agents against *Varroa destructor*. **Industrial Crops & Products**. v. 158, 2020

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 9235:2013**. Aromatic natural raw materials – Vocabulary. Genebra, p. 35, 2013.

KUPSKI, Sérgio Carlos. **Modelagem matemática do processo de extração Supercrítica de *humulus lupulus* l. com co2**. 113 f. Dissertação (Engenharia Química), programa de pós-graduação, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE, Toledo, Paraná, 2015

LANGZAAL, C. R.; CHANDRA, A.; SCHEFFER, J. J. C. Antimicrobial screening of essential oils and extracts of some *Humulus lupulus* L. cultivars. **National Library of Medicine (NLM), PubMed, National Center for Biotechnology Information**, v. 14, n. 6, p. 353–356, 1992.

LEMP, B. Avanços metodológicos da microscopia na avaliação de alimentos. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.36, suplemento especial, p.315-329, 2007.

MACHADO, J. C.; FARIA, M. A.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O. **Hops: New Perspectives for an Old Beer Ingredient**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Mapa e IICA desenvolvem projeto para fomentar cultivo de lúpulo no Brasil**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-e-ica-desenvolvem-projeto-para-fomentar-a-cultura-do-lupulo-no-brasil>>. Acesso em: 12 fev. 2021.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instruções para execução dos ensaios de distinguibilidade, homogeneidade e estabilidade de cultivares de lúpulo (*Humulus lupulus* L.)**. Disponível em: <[https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protacao-de-cultivar/arquivos-agricolas/lupulo\\_formulario\\_15ago2016p.doc/view](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/protacao-de-cultivar/arquivos-agricolas/lupulo_formulario_15ago2016p.doc/view)>. 2016.

MCCALLUM, J. L. et al. Phytochemical characterization of wild Hops (*Humulus lupulus* ssp. *lupuloides*) germplasm resources from the Maritimes region of Canada. **Frontiers in Plant Science**, 2019.

MILLIGAN, S.R., KALITA, J.C., HEYERICK, A., RONG, H., DE COOMAN, L., E DE KEUKELEIRE, D. Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. **National Library of Medicine (NLM), PubMed, National Center for Biotechnology Information**, v. 83, n. 6, p. 2249–2252, 2012.

MIRANDA, C. L. et al. Antiproliferative and Cytotoxic Effects of Prenylated Flavonoids from Hops ( *Humulus lupulus* ) in Human Cancer Cell Lines. **National Library of Medicine (NLM), PubMed, National Center for Biotechnology Information.**, v. 37, p. 271–285, 1999.

MORAES, H. H. Q., **Otimização experimental da extração do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale*)**, 2012, 133f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Pará – Belém, 2012.

NEVE, R. A. **Hops. In: Evolution of crop plants**. New York: Longman Inc., 1976.

PARKES, S. **Hop Chemistry: Homebrew Science**. Disponível em: <<http://www.byo.com/departments/884.html>>. Acesso em: 19 out. 2020.

PALMER, J.; **How to brew: everything you need to know to brew great beer every time**, 4th ed., **Brewers Publications**, 2017.

REIS, G. G. et al. Estudo do efeito da secagem em convecção natural e forçada na composição do óleo essencial da citronela (*Cymbopogon nardus*). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Vol. 08, No. 04, pág. 47-55, 2006.

RETTBERG, N.; BIENDL, M.; GARBE, L.; J. **American Society Brew Chemistry**. n. 76, 2018.

REVISTA DA CERVEJA. **Encontro Brasileiro de Pesquisadores e Produtores de Lúpulo acontecerá em novembro**. Disponível em: <<https://revistadacerveja.com.br/encontro-brasileiro-de-pesquisadores-e-produtores-de-lupulo-acontecera-em-novembro/>>. Acesso em: 12 fev. 2021.

ROCHA, Filomena Alexandra dos Santos; **Distribuição e ecologia do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) em Portugal**. 2005. 173 f. Tese (Mestrado em Ciências do Ambiente). Universidade de Minho, Departamento de Biologia. DOI: 10.13140/2.1.5052.8962.

RODOLFI, M. et al; Changes in chemical profile of Cascade hop cones according to the growing area. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 9, n. 13, p.

6011-6019, 2019.

SANTOS, M.S.; et al; **Extração e Caracterização Físico-Química do Óleo Essencial de Capim-Limão (*Cymbopogon citratus*)**. Disponível em: <[http://www.abq.org.br/cbq/trabalhos\\_aceitos\\_detalhes,4817.html](http://www.abq.org.br/cbq/trabalhos_aceitos_detalhes,4817.html)> CBQ – Congresso Brasileiro de Química, 2014

SHARP, D. C. et al. Effect of harvest maturity on the chemical composition of cascade and willamette hops. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 72, n. 4, p. 231–238, 2014.

SHRINER, R. L. et al. **Identificação Sistemática dos Compostos Orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983.

TRANCOSO; M. D. et al. **ÓLEOS ESSENCIAIS: EXTRAÇÃO, IMPORTÂNCIA E APLICAÇÕES NO COTIDIANO**. Disponível em: <[www.abq.org.br/cbq/2013/trabalhos/14/2780-17038.html](http://www.abq.org.br/cbq/2013/trabalhos/14/2780-17038.html)> CBQ – Congresso Brasileiro de Química, 2013

USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA. **VARIET Y SNAPSHOT**. United States Of America. Disponível em: <<https://www.usahops.org/hop-finder/varieties.html>>. 2020.

USAHOPS - HOP GROWERS OF AMERICA. **STATISTICAL REPORT 2020**. Yakima: [s.n.]. Disponível em: <[https://www.usahops.org/img/blog\\_pdf/346.pdf](https://www.usahops.org/img/blog_pdf/346.pdf)>. 2020.

WEISLER, H. E. Review of Hop Analysis Methods. **Proceedings. Annual meeting - American Society of Brewing Chemists**, v. 12, n. 1, p. 57–62, 1954.

WOLFFENBÜTTEL, A. Mas afinal o que são óleos essenciais. **Informativo CRQ-V**, v. XI, p. 6–7, 2007.

WOLFFENBUTTEL, A. N.; **Óleos essenciais**. Informativo CRQ-V ano XI, n. 105, p. 06-07. 2007.

YASUKAWA, K., TAKEUCHI, M. E TAKIDO, M. Humulon, a bitter in the hop, inhibits tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin. **National Library of Medicine (NLM), PubMed, National Center for Biotechnology Information.**, 1995.

## ANEXO A

Neste anexo serão apresentadas as imagens fotográficas realizada de um microscópio durante o estudo, com o propósito de avaliar a superfície foliar dos cones de lúpulo, identificando assim possíveis fissuras estruturas, bem como a presença de lupulina.

Imagem 04 - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 2X - cultivar COLUMBUS



Imagem 05 - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 1X - cultivar COLUMBUS



Imagem 06 - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 2X - cultivar CENTENIAL



Imagem 07 - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 1X - cultivar CENTENIAL





Imagem 08 - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 2X - cultivar CHINOOK



Imagem 09 - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 1X - cultivar CHINOOK

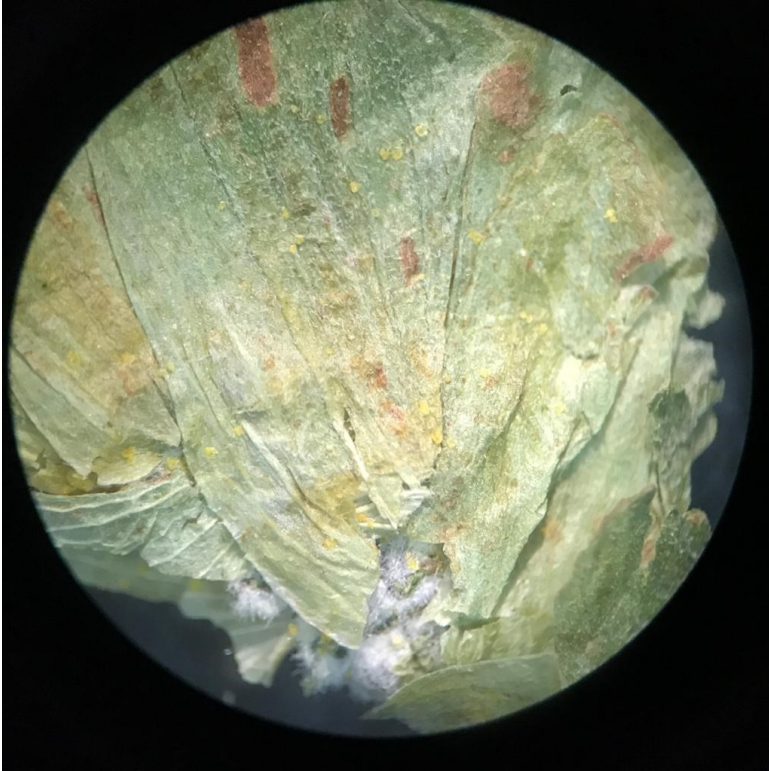


Imagem 10 - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 2X - cultivar COMET



Imagem 11 - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 1X - cultivar COMET

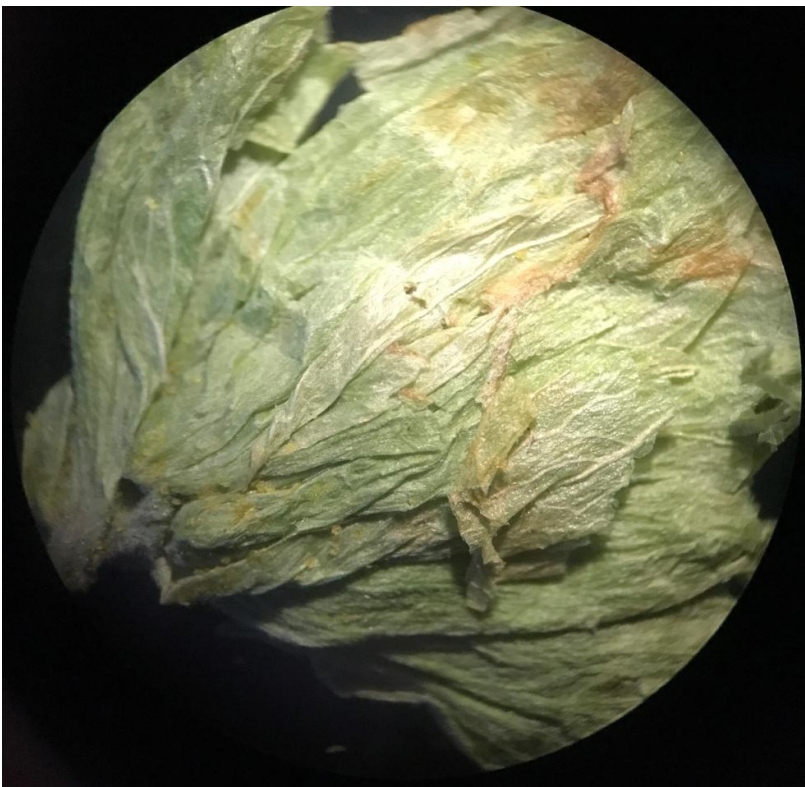


Imagem 12 - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 2X - cultivar H-MITT

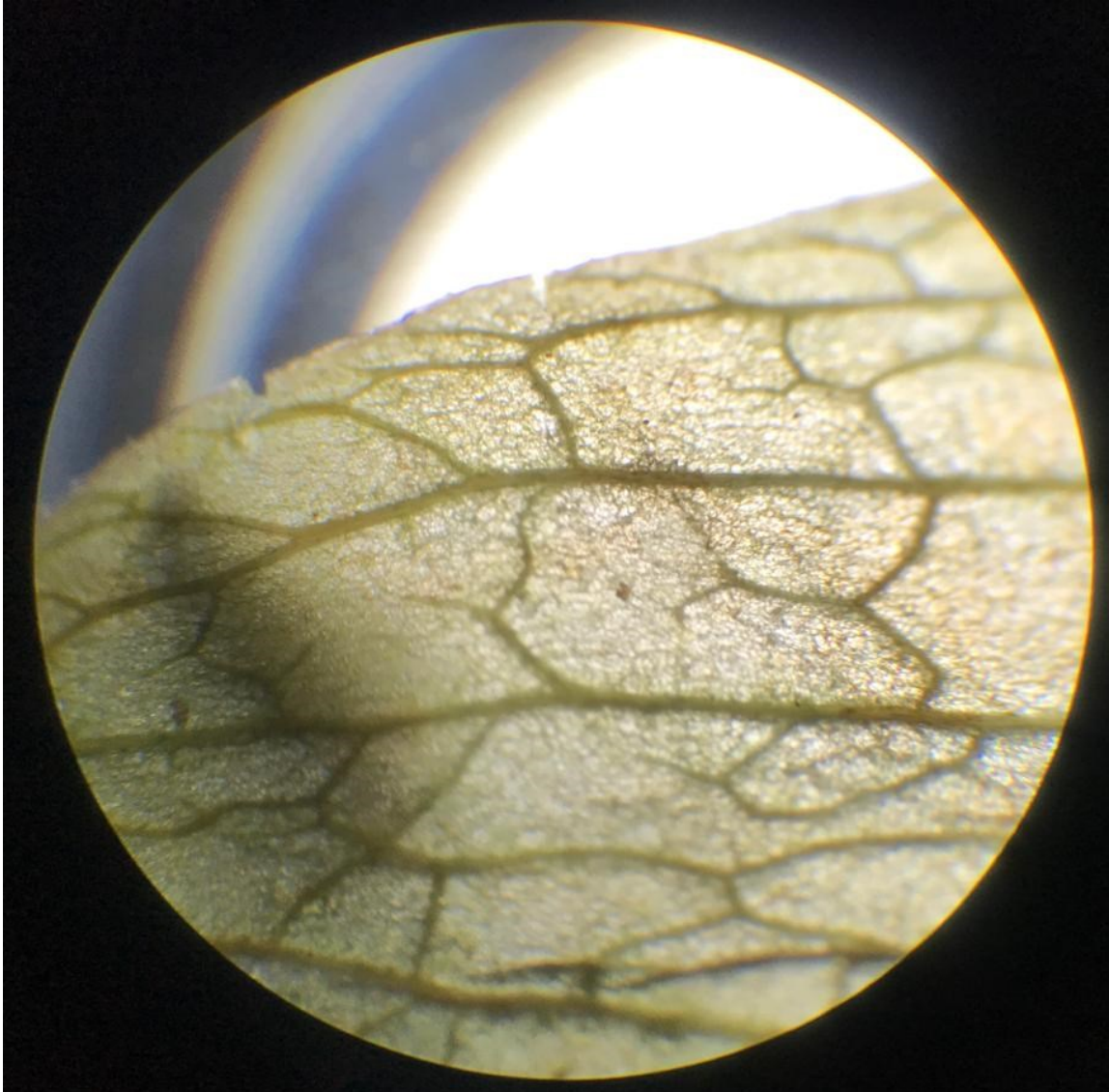
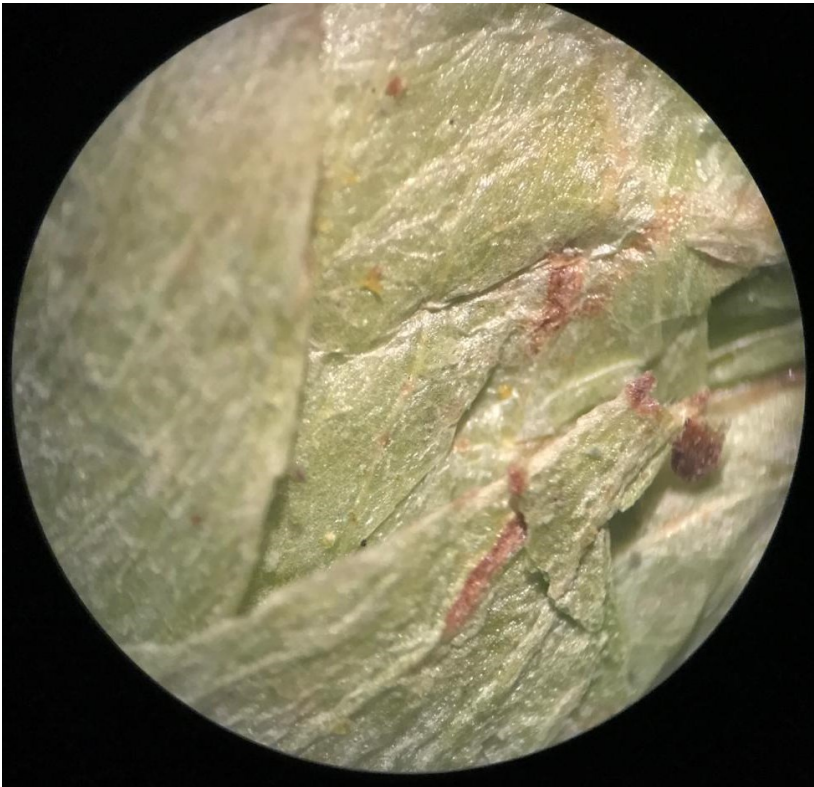


Imagem 13 - Microscopia Óptica com objetiva de aumento em 1X - cultivar H-MITT



## ANEXO B

Neste anexo serão apresentados os espectros obtidos pelas análises de CG/FID e CG/MS das amostras de Cascade.

Figura 19 - Cromatograma CG/FID amostra Clevenger - 01

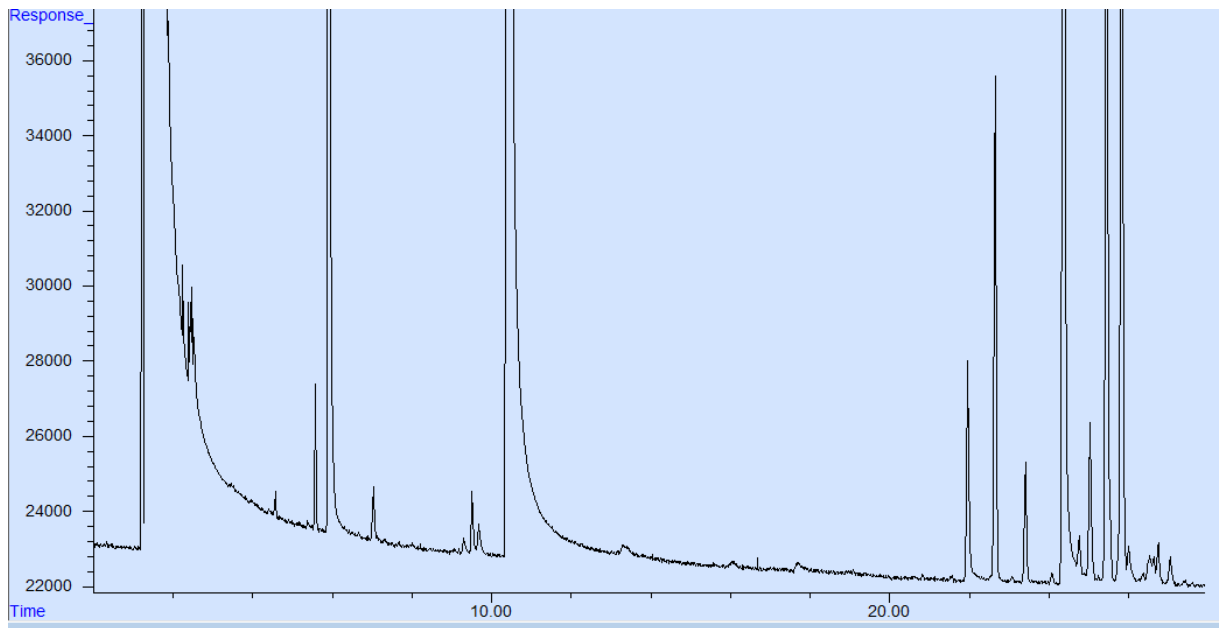


Figura 20 - Cromatograma CG/FID amostra Farmacopeico - 01

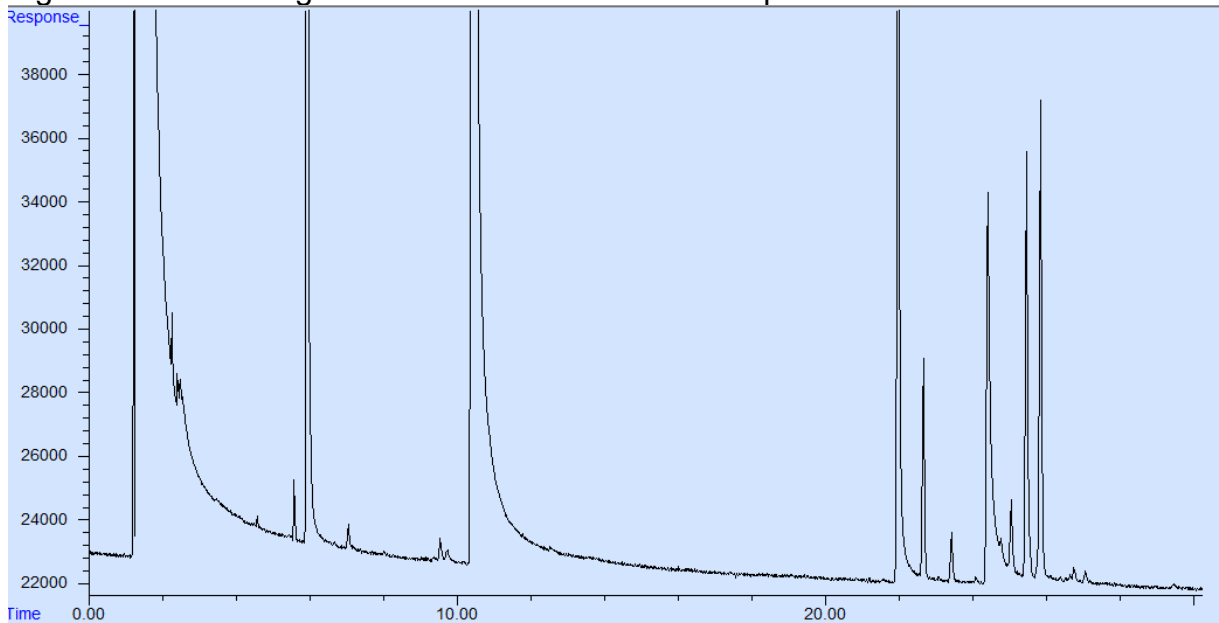


Figura 21 - Cromatograma CG/FID amostra Clevenger - 02

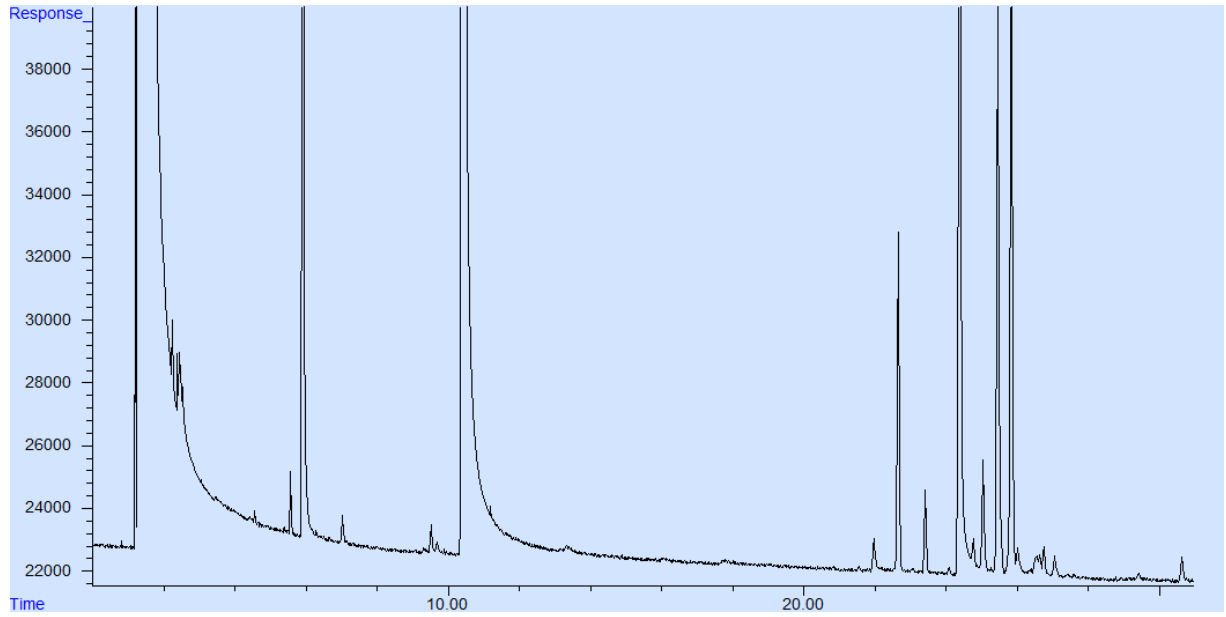


Figura 22 - Cromatograma CG/FID amostra Farmacopeico - 02

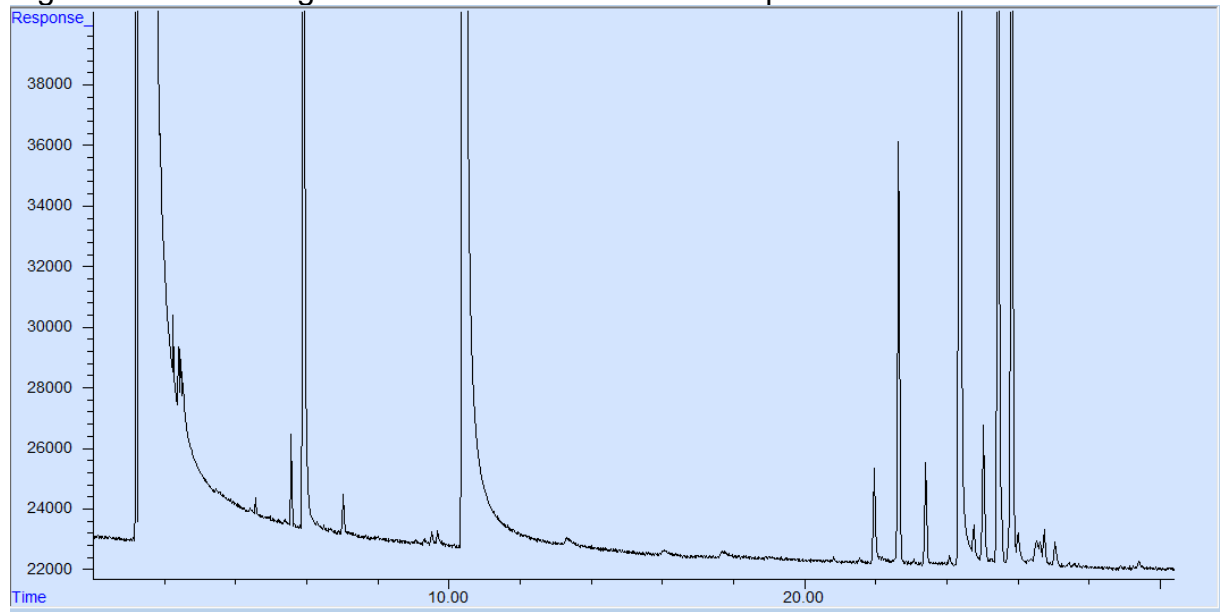




Figura 23 - Cromatograma CG/FID amostra Clevenger - 03

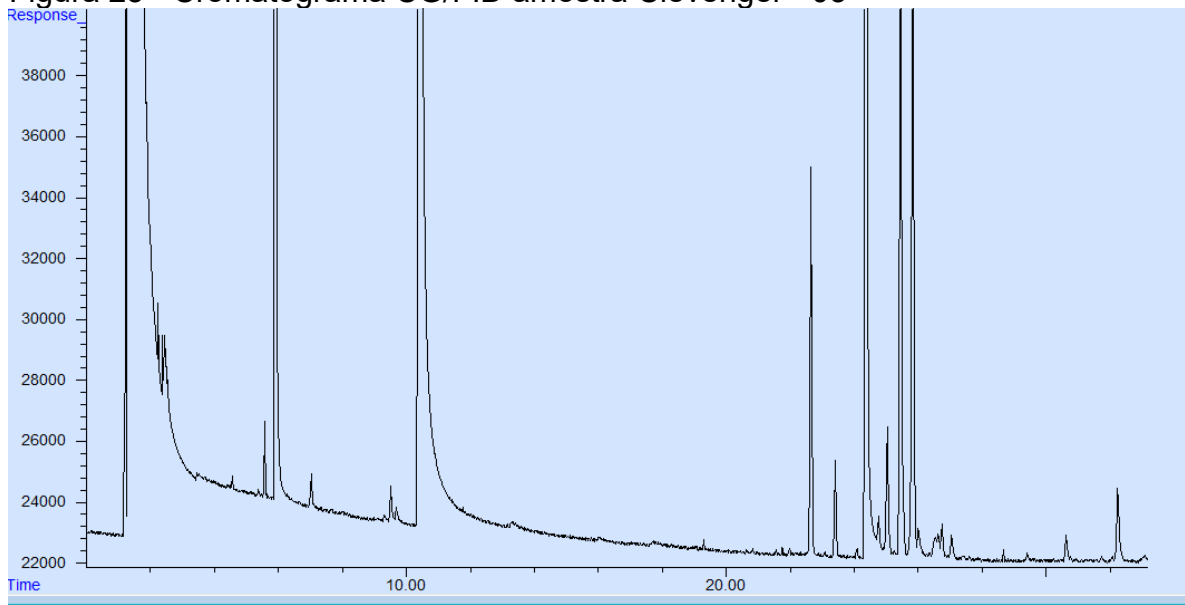


Figura 24 - Cromatograma CG/FID amostra Farmacopeico - 03

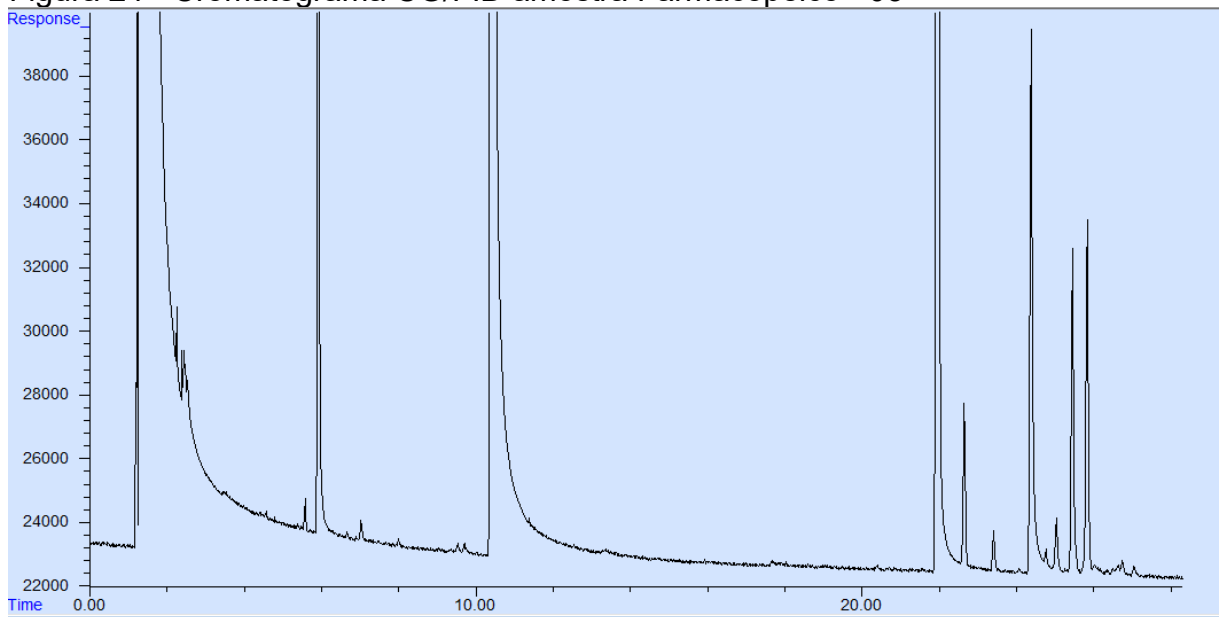


Figura 25 - Cromatograma CG/FID amostra Clevenger - 04

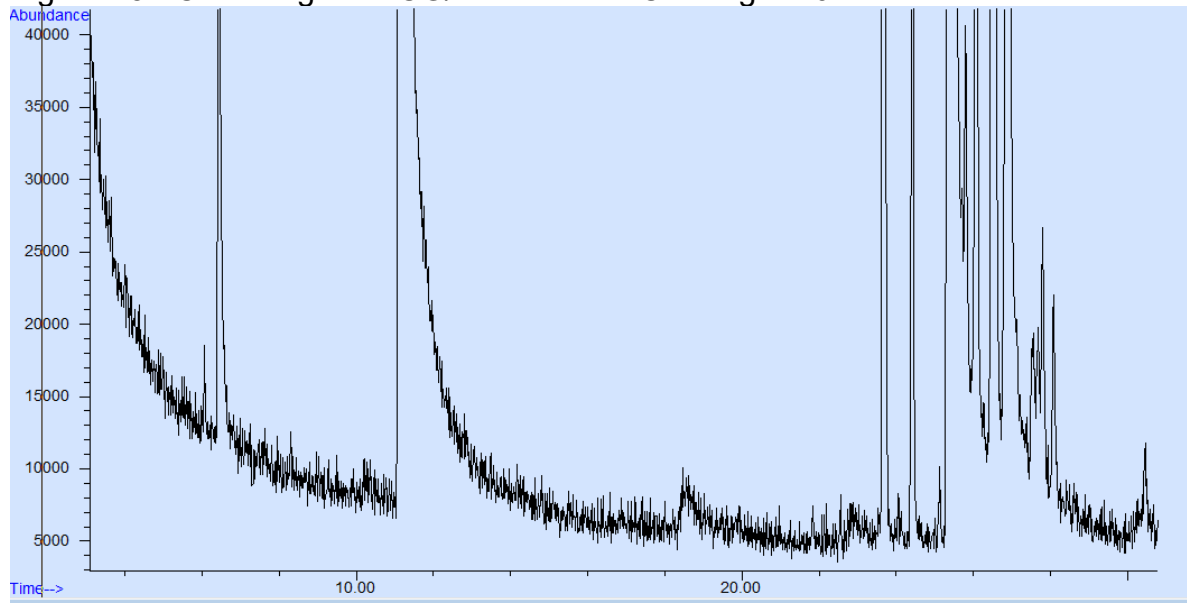


Figura 26 - Cromatograma CG/FID amostra Farmacopeico - 04

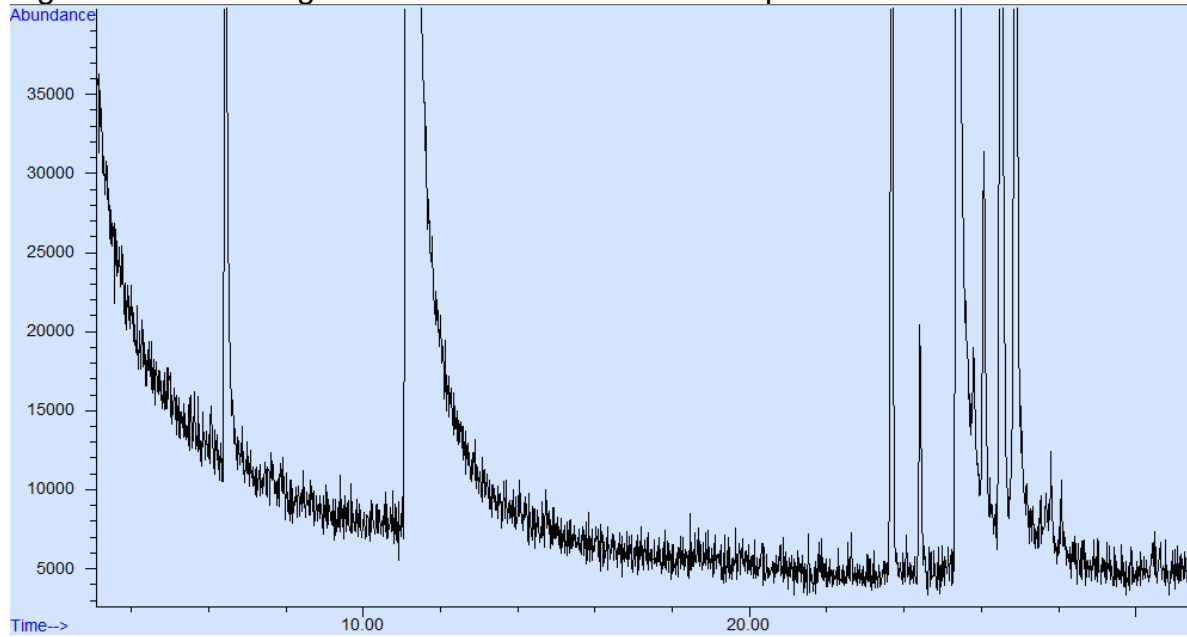
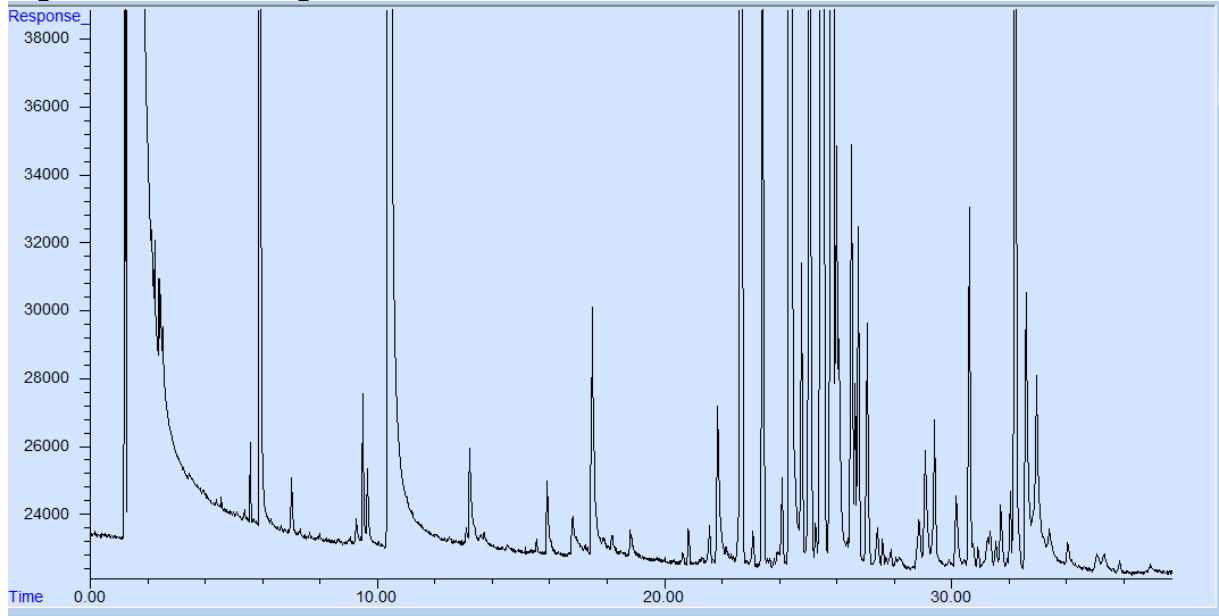


Figura 27 - Cromatograma CG/FID amostra Padrão



## ANEXO C - LEI N. 9.610, DE 19 DE FEVEREIRO DE 1998



Presidência da República  
Casa Civil  
Subchefia para Assuntos Jurídicos

### LEI Nº 9.610, DE 19 DE FEVEREIRO DE 1998<sup>3</sup>.

Altera, atualiza e consolida a legislação sobre direitos autorais e dá outras providências.

O PRESIDENTE DA REPÚBLICA Faço saber que o Congresso Nacional decreta e eu sanciono a seguinte Lei -

#### Título I - Disposições Preliminares

Art. 1º Esta Lei regula os direitos autorais, entendendo-se sob esta denominação os direitos de autor e os que lhes são conexos.

Art. 2º Os estrangeiros domiciliados no exterior gozarão da proteção assegurada nos acordos, convenções e tratados em vigor no Brasil.

Parágrafo único. Aplica-se o disposto nesta Lei aos nacionais ou pessoas domiciliadas em país que assegure aos brasileiros ou pessoas domiciliadas no Brasil a reciprocidade na proteção aos direitos autorais ou equivalentes.

Art. 3º Os direitos autorais reputam-se, para os efeitos legais, bens móveis.

Art. 4º Interpretam-se restritivamente os negócios jurídicos sobre os direitos autorais.

Art. 5º Para os efeitos desta Lei, considera-se:

I - publicação - o oferecimento de obra literária, artística ou científica ao conhecimento do público, com o consentimento do autor, ou de qualquer outro titular de direito de autor, por qualquer forma ou processo;

II - transmissão ou emissão - a difusão de sons ou de sons e imagens, por meio de ondas radioelétricas; sinais de satélite; fio, cabo ou outro condutor; meios óticos ou qualquer outro processo eletromagnético;

III - retransmissão - a emissão simultânea da transmissão de uma empresa por outra;

IV - distribuição - a colocação à disposição do público do original ou cópia de obras literárias, artísticas ou científicas, interpretações ou execuções fixadas e fonogramas, mediante a venda, locação ou qualquer outra forma de transferência de propriedade ou posse;

V - comunicação ao público - ato mediante o qual a obra é colocada ao alcance do público, por qualquer meio ou procedimento e que não consista na distribuição de exemplares;

VI - reprodução - a cópia de um ou vários exemplares de uma obra literária, artística ou científica ou de um fonograma, de qualquer forma tangível, incluindo qualquer armazenamento permanente ou temporário por meios eletrônicos ou qualquer outro meio de fixação que venha a ser desenvolvido;

VII - contrafação - a reprodução não autorizada;

VIII - obra:

a) em co-autoria - quando é criada em comum, por dois ou mais autores;

b) anônima - quando não se indica o nome do autor, por sua vontade ou por ser desconhecido;

c) pseudônima - quando o autor se oculta sob nome suposto;

d) inédita - a que não haja sido objeto de publicação;

e) póstuma - a que se publique após a morte do autor;

f) originária - a criação primígena;

g) derivada - a que, constituindo criação intelectual nova, resulta da transformação de obra originária;

h) coletiva - a criada por iniciativa, organização e responsabilidade de uma pessoa física ou jurídica, que a publica sob seu nome ou marca e que é constituída pela participação de diferentes autores, cujas contribuições se fundem numa criação autônoma;

i) audiovisual - a que resulta da fixação de imagens com ou sem som, que tenha a finalidade de criar, por meio de sua reprodução, a impressão de movimento, independentemente dos processos de sua captação, do suporte usado inicial ou posteriormente para fixá-lo, bem como dos meios utilizados para sua veiculação;

IX - fonograma - toda fixação de sons de uma execução ou interpretação ou de outros sons, ou de uma representação de sons que não seja uma fixação incluída em uma obra audiovisual;

X - editor - a pessoa física ou jurídica à qual se atribui o direito exclusivo de reprodução da obra e o dever de divulgá-la, nos limites previstos no contrato de edição;

XI - produtor - a pessoa física ou jurídica que toma a iniciativa e tem a responsabilidade econômica da primeira fixação do fonograma ou da obra audiovisual, qualquer que seja a natureza do suporte utilizado;

XII - radiodifusão - a transmissão sem fio, inclusive por satélites, de sons ou imagens e sons ou das representações desses, para recepção ao público e a transmissão de sinais codificados, quando os meios de decodificação sejam oferecidos ao público pelo organismo de radiodifusão ou com seu consentimento;

XIII - artistas intérpretes ou executantes - todos os atores, cantores, músicos, bailarinos ou outras pessoas que representem um papel, cantem, recitem, declamem, interpretem ou executem em qualquer forma obras literárias ou artísticas ou expressões do folclore.

Art. 6º Não serão de domínio da União, dos Estados, do Distrito Federal ou dos Municípios as obras por eles simplesmente subvencionadas.

<sup>3</sup> Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/19610.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/19610.htm).